

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO MICROBIOLOGÍA II**



**TESIS DOCTORAL**

**Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de  
enterobacterias productoras de carbapenemasa oxa-48 en el contexto  
de un brote hospitalario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Guillermo Ruiz Carrascoso**

DIRECTOR

**Jesús Mingorance Cruz**

**Madrid, 2016**



## **FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**

# **CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y CLÍNICO- EPIDEMIOLÓGICAS DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASA OXA-48 EN EL CONTEXTO DE UN BROTE HOSPITALARIO**

**Memoria para optar al grado de Doctor presentada por  
Guillermo Ruiz Carrascoso**

Bajo la dirección del doctor  
Jesús Mingorance Cruz

Madrid, 2015





U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**FACULTAD DE FARMACIA**  
Departamento de Microbiología II

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y CLÍNICO-  
EPIDEMIOLÓGICAS DE ENTEROBACTERIAS  
PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASA OXA-48 EN  
EL CONTEXTO DE UN BROTE HOSPITALARIO**

**Memoria para optar al grado de Doctor presentada por  
Guillermo Ruiz Carrascoso**

Director del proyecto  
Dr. Jesús Mingorance Cruz

Servicio de Microbiología y Parasitología



**Hospital Universitario La Paz**

Hospital de Cantoblanco  
Hospital Carlos III

 **Comunidad de Madrid**

**IdiPAZ**  
Instituto de Investigación  
Hospital Universitario La Paz



**Servicio de  
Microbiología  
y Parasitología**



*A mis padres,  
Sin su esfuerzo no habría podido llegar hasta aquí*



Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Jesús Mingorance Cruz, por su motivación, paciencia y su esfuerzo para que este trabajo llegara a buen fin, siempre te agradeceré que me hayas ayudado a hacerme Doctor.

Al Dr. Julio García Rodríguez, Jefe de Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario La Paz por su apoyo y toda la confianza que ha depositado en mí y en mi trabajo.

Al Dr. Avelino Gutiérrez Altés, por haberme dado la oportunidad de formar parte del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario La Paz.

A todo el personal del Servicio de Microbiología Clínica y la Sección de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen Macarena, por su acogida y haberme hecho tan provechosa mi estancia en Sevilla, y muy especialmente a la Dra. Lorena López Cerero por iniciarme en el mundo de la vigilancia de la infección nosocomial.

A todo el Servicio de Medicina Preventiva y a todos mis compañeros de la Unidad de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas por todo lo que hemos compartido y aprendido mientras afrontábamos este brote, y muy especialmente al personal de enfermería del Servicio de Medicina Preventiva por todo su apoyo, confianza y cariño en el día a día.

Al Servicio de Control de Gestión y Análisis de la Información del Hospital Universitario a La Paz por ser tan amables y facilitarme los datos del hospital en tiempo record.

Al Dr. Alberto Delgado-Iribarren de la Unidad de Microbiología del Hospital Fundación Alcorcón y a mis compañeros de los "hospitales del anillo", por permitirme trabajar en su unidad y participar en su proyecto.

A todos los que fueron mis compañeros del Centro Nacional de Microbiología, son muchos para enumerar pero ellos saben quienes son, gracias por enseñarme virología y biología molecular.



A todos mis compañeros y al Servicio de Microbiología del Hospital La Paz al completo: técnicos, enfermería, auxiliares, administrativos, becari@s, investigadores y facultativos. Besos y abrazos a los que fueron mis adjuntos durante mi residencia y muy especialmente a mis "erres mayores": Mariajo, Ali Rico, Rosa, María Luisa, Ali Gómez y Silvia, por hacerme sentir orgulloso de ejercer la Microbiología Clínica, y sobre todo, por compartir una de las mejores épocas a nivel profesional y personal que recuerdo. Sin olvidar a Mila, Susana e Isabel, por esas tardes de confidencias y meriendas durante las guardias.

A mis compañeras, y sin embargo amigas, Inma y Nati, por las risas, lamentos, por ofrecerme siempre ayuda y muy especialmente por su amistad. A Emilio, por lo canutas que lo estamos pasando para acabar a tiempo.

A mis amigos, Franc, David, Rocker, Germán, Mary, Anita, Eva, Iván, Andrés, Juan Car, Rafa, Leti, Javi, Isa y Víctor, por animarme, abrazarme y sacarme de casa cuando necesitaba un respiro. A Óscar, por su apoyo incondicional y dejarme su oficina los "findes" para encerrarme a escribir parte de esta tesis, sé que siempre estarás ahí. A Soledad, por su alegría, eterna sonrisa y tratarme como a uno más de la familia.

A los que siempre estarán en mi recuerdo: mis abuelos, Juanma, Susie y Nacho.

A toda mi familia, muy especialmente a mis padres, mi hermano y mi sobrina, porque todos de alguna u otra forma cuidan de mí.

## **Abreviaturas y siglas**



Abreviatura	Equivalencia
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI <sub>50</sub>	Concentración mínima que inhibe al 50% de las cepas
CMI <sub>90</sub>	Concentración mínima que inhibe al 90% de las cepas
DHP-I	Dehidropeptidasa I renal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFH	Grupo Funcional Homogéneo
Kb	Kilobases
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
Pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SIL	Sistema de Información del Laboratorio
ST	Secuencia tipo
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-Acetato-EDTA
THM	Test de Hodge modificado
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
Ufc	Unidades formadoras de colonia



## Índice



<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1. <u>La familia <i>Enterobacteriaceae</i></u>	2
1.1. Epidemiología	13
1.2. Evolución temporal de la resistencia a los antibióticos betalactámicos	16
1.3. Factores de riesgo asociados con la colonización e infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa	19
2. <u>Antibióticos carbapenémicos</u>	21
2.1 Estructura química	21
2.2. Mecanismo de acción	23
2.3. Espectro y actividad antimicrobiana	25
2.4. Farmacocinética	29
2.5. Características farmacocinéticas-farmacodinámicas (PK/PD)	30
2.6. Indicaciones clínicas	31
3. <u>Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos en enterobacterias</u>	33
3.1. Mecanismos de resistencia no mediados por carbapenemasas	33
3.2. Mecanismos de resistencia mediados por carbapenemasas	35
3.2.1. Carbapenemasas de clase A	38
3.2.2. Carbapenemasas de clase B	39
3.2.3. Carbapenemasas de clase D	41
4. <u>Carbapenemasas del tipo OXA-48 y "OXA-48 like"</u>	42
<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
1. <u>Ámbito del estudio, características y recogida de datos</u>	51
2. <u>Muestras clínicas</u>	53
3. <u>Muestras de colonización</u>	54
4. <u>Identificación bacteriana y antibiograma</u>	54
5. <u>Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido y AmpC</u>	57
6. <u>Detección fenotípica de carbapenemasas</u>	58
7. <u>Extracción de ADN</u>	59
7.1. Hervido/lisis bacteriana	59
7.2. Purificación del ADN bacteriano	59
8. <u>Caracterización genotípica de betalactamasas</u>	59



9. <u>Detección genotípica de carbapenemasas</u> .....	62
9.1. PCR convencional a tiempo final.....	62
9.2. PCR a tiempo real.....	64
10. <u>Caracterización genotípica de genes de resistencia a quinolonas localizados en plásmidos</u> .....	66
11. <u>Tipado molecular</u> .....	67
11.1. RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ).....	67
11.2. rep-PCR ( <i>Repetitive Extragenic Palindrom-PCR</i> ) automatizada.....	68
11.3. MLST ( <i>Multilocus Sequence Typing</i> ).....	69
12. <u>Secuenciación</u> .....	72
13. <u>Análisis estadístico</u> .....	73
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
1. <u>Antecedentes e inicio del brote</u> .....	77
2. <u>Diseminación y extensión del brote en el periodo de diciembre 2010 a junio 2013</u> .....	81
3. <u>Estructura del brote</u> .....	85
3.1. Incidencia en las Unidades de Hospitalización del Hospital Universitario La Paz.....	87
3.1.1. Servicios médicos del Hospital General.....	87
3.1.2. Servicios quirúrgicos del Hospital General.....	91
3.1.3. Unidad de Críticos Médica y Unidad de Quemados Críticos.....	93
3.1.4. Nefrología, Cirugía Vascular y Neurocirugía del Hospital General.....	93
3.1.5. Hospital de Traumatología y Rehabilitación.....	94
3.1.6. Hospital Maternal y Hospital Infantil.....	95
3.1.7. Hospital Cantoblanco.....	97
4. <u>Características demográficas, epidemiológicas y clínicas</u> .....	98
5. <u>Aislados bacterianos</u> .....	104
6. <u>Aislados clínicos y de colonización de <i>K. pneumoniae</i>: características poblacionales y genotípicas</u> .....	107
6.1. rep-PCR automatizada Diversilab™.....	107
6.2. MLST.....	111
6.3. Caracterización de genes de resistencia y entorno genético.....	113
6.4. Caracterización de genes y marcadores de resistencia mediante secuenciación de genomas completos.....	115
7. <u>Características de sensibilidad a antibióticos</u> .....	116
7.1. Características de sensibilidad a antibióticos betalactámicos.....	117
7.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	117
7.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	122

7.1.3. Características de sensibilidad en otras especies .....	122
7.2. Características de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos .....	123
7.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	123
7.2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	126
7.2.3. Características de sensibilidad en otras especies .....	127
7.3. Enterobacterias panresistentes y extremadamente resistentes .....	127
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>129</b>
1. <u>Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 e inicio del brote</u> .....	133
2. <u>Diseminación del brote</u> .....	136
3. <u>Características clínico-epidemiológicas y microbiológicas</u> .....	137
4. <u>Epidemiología molecular</u> .....	140
5. <u>Características de resistencia a antibióticos e implicaciones terapéuticas</u> .....	145
6. <u>Lecciones aprendidas del brote por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48</u> .....	150
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>157</b>
<b>ABSTRACT/RESUMEN</b> .....	<b>177</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>189</b>



## **Índice de tablas**



<b>Tabla 1.</b> Enterobacterias comensales y patógenas aisladas en humanos: <b>Página 10</b>
<b>Tabla 2.</b> Principales enterobacterias productoras de infección del tracto urinario en España: <b>Página 13</b>
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos aislados en las principales infecciones intra-UCI: <b>Página 16</b>
<b>Tabla 4.</b> Factores de riesgo vinculados a la colonización e infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa: <b>Página 20</b>
<b>Tabla 5.</b> Espectro de actividad de los antibióticos carbapenémicos: <b>Página 26</b>
<b>Tabla 6.</b> Intervalos de CMI de los carbapenémicos frente a enterobacterias: <b>Página 28</b>
<b>Tabla 7.</b> Características farmacocinéticas de los antibióticos carbapenémicos: <b>Página 29</b>
<b>Tabla 8.</b> Clases y características de las carbapenemasas más prevalentes en enterobacterias: <b>Página 36</b>
<b>Tabla 9.</b> Espectro de actividad e inhibidores de las carbapenemasas más prevalentes en enterobacterias: <b>Página 37</b>
<b>Tabla 10.</b> Cebadores utilizados en la detección de genes de BLEE: <b>Página 60</b>
<b>Tabla 11.</b> Mezcla de reacción para la detección de BLEE mediante PCR a tiempo final: <b>Página 61</b>
<b>Tabla 12.</b> Cebadores utilizados en la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo final: <b>Página 63</b>
<b>Tabla 13.</b> Mezcla de reacción para la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo final en formato múltiple: <b>Página 64</b>
<b>Tabla 14.</b> Cebadores y sondas utilizados en la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo real: <b>Página 65</b>
<b>Tabla 15.</b> Mezcla de reacción empleada para la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo real: <b>Página 66</b>
<b>Tabla 16.</b> Cebadores empleados para la caracterización genotípica mediante RAPD: <b>Página 67</b>
<b>Tabla 17.</b> Mezcla de reacción utilizada para la caracterización genotípica mediante RAPD: <b>Página 67</b>
<b>Tabla 18.</b> Mezcla de reacción utilizada para la caracterización genotípica mediante rep-PCR automatizada: <b>Página 68</b>
<b>Tabla 19.</b> Cebadores y condiciones de las reacciones de amplificación utilizadas para la caracterización genotípica mediante MLST: <b>Página 71</b>
<b>Tabla 20.</b> Antibiógrama interpretado de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> productoras de carbapenemasa OXA-48: <b>Página 77</b>
<b>Tabla 21.</b> Distribución de los aislados según el tipo de muestras clínicas: <b>Página 100</b>
<b>Tabla 22.</b> Distribución según el tipo de muestra en el que se obtuvo el primer aislado o primera muestra incidente: <b>Página 101</b>
<b>Tabla 23.</b> Proporción de especies bacterianas en muestras clínicas y de colonización: <b>Página 105</b>
<b>Tabla 24.</b> Genes y marcadores de resistencia de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> ST405 y ST11 obtenidos mediante secuenciación de genomas completos: <b>Página 116</b>
<b>Tabla 25.</b> Distribución por especies, número de aislados y número de pacientes a los que se les realizó estudio de sensibilidad: <b>Página 117</b>
<b>Tabla 26.</b> Características de sensibilidad a cefoxitina y carbapenémicos en aislados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> productores de carbapenemasa OXA-48: <b>Página 118</b>

**Tabla 27.** Cepas clínicas de *K. pneumoniae* ST405 y ST11 con valores de CMI  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  frente a imipenem y meropenem: **Página 120**

**Tabla 28.** Sensibilidad a los carbapenémicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48 sensibles y no sensibles a ceftioxitina: **Página 121**

**Tabla 29.** Sensibilidad a ceftioxitina y carbapenémicos en cepas clínicas ST405 y ST11 de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48: **Página 122**

**Tabla 30.** Características de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48: **Página 123**

**Tabla 31.** Sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48 sensibles y no sensibles a ceftioxitina: **Página 125**

**Tabla 32.** Sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en cepas clínicas ST405 y ST11 de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48: **Página 126**

**Tabla 33.** Características de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en aislados clínicos de *E. coli* productores de carbapenemasa OXA-48: **Página 127**

# Índice de figuras





**Figura 1.** Estructura de la membrana celular y pared celular de enterobacterias: **Página 12**

**Figura 2.** Distribución de los microorganismos aislados en las infecciones de origen nosocomial y comunitario en España: **Página 15**

**Figura 3.** Mapa de incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasa en Europa: **Página 19**

**Figura 4.** Estructura química de los antibióticos carbapenémicos: **Página 22**

**Figura 5.** Esquema de la actividad transpeptidasa de las PBPs en la síntesis del peptidoglucano: **Página 24**

**Figura 6.** Mecanismo de hidrólisis del anillo betalactámico mediado por carbapenemasas: **Página 35**

**Figura 7.** Representación esquemática de la estructura genética asociada al gen que codifica para la carbapenemasa OXA-48: **Página 42**

**Figura 8.** RAPD de las primeras cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48 aisladas en el Hospital Universitario La Paz: **Página 79**

**Figura 9.** Incidencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos en el Hospital Universitario La Paz antes y en el inicio del brote: **Página 80**

**Figura 10.** Casos incidentes mensuales y casos acumulados: **Página 82**

**Figura 11.** Tasas de incidencia mensuales en pacientes hospitalizados ajustadas por 1.000 ingresos y 10.000 estancias: **Página 82**

**Figura 12.** Distribución de casos por procedencias: **Página 83**

**Figura 13.** Distribución de casos por GFH de las unidades de hospitalización médicas, quirúrgicas y unidades de críticos del Hospital Universitario La Paz: **Página 84**

**Figura 14.** Estructura del brote en los distintos GFH del Hospital Universitario La Paz a lo largo del tiempo: **Página 86**

**Figura 15.** Incidencia en los tres GFH que constituyen el Servicio de Medicina Interna: **Página 88**

**Figura 16.** Incidencia en Neumología: **Página 89**

**Figura 17.** Incidencia en unidades con pacientes inmunodeprimidos: **Página 90**

**Figura 18.** Incidencia en la denominada Área del Corazón: **Página 90**

**Figura 19.** Incidencia en los servicios de Cirugía General y Aparato Digestivo: **Página 91**

**Figura 20.** Incidencia en las unidades de pacientes críticos quirúrgicos: **Página 92**

**Figura 21.** Incidencia en los servicios de Urología y Cirugía Cardiotorácica: **Página 92**

**Figura 22.** Incidencia en la UCI Médica y Unidad de Quemados Críticos: **Página 93**

**Figura 23.** Incidencia en nefrología, neurocirugía y cirugía vascular: **Página 94**

**Figura 24.** Incidencia en el Hospital de Traumatología y Rehabilitación: **Página 95**

**Figura 25.** Incidencia en la unidad de Reanimación del Hospital Maternal y Neonatología del Hospital Infantil: **Página 96**

**Figura 26.** Incidencia en el Hospital Cantoblanco: **Página 97**

**Figura 27.** Pirámide de población de los pacientes infectados/colonizados por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48: **Página 98**

**Figura 28.** Distribución temporal de la primera muestra incidente: **Página 99**

**Figura 29.** Dendrograma de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48 y carbapenemasa tipo VIM: **Página 108**

**Figura 30.** Frecuencias de los distintos clones de *K. pneumoniae* caracterizados durante el brote mediante rep-PCR automatizada: **Página 109**

**Figura 31.** Estructura poblacional a lo largo del tiempo de los distintos clones de *K. pneumoniae* analizados mediante rep-PCR automatizada: **Página 110**

**Figura 32.** Dendrograma con distintos clones de *K. pneumoniae* obtenidos mediante el sistema Diversilab™ y sus correspondientes secuenciotipos: **Página 112**

**Figura 33.** Distribución de los secuenciotipos mayoritarios ST405 y ST11 en los distintos GFH a lo largo del tiempo en el Hospital Universitario La Paz: **Página 114**

**Figura 34.** Curvas de distribución de CMI para imipenem y meropenem en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48: **Página 119**

**Figura 35.** Curva de distribución de CMI para ertapenem en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48: **Página 119**

# Introducción



Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar, dependiendo del tipo, todos o casi todos los antibióticos betalactámicos. La presencia de otros mecanismos de resistencia concomitantes en las bacterias productoras de carbapenemasa es frecuente, originando cepas extremadamente resistentes o incluso panresistentes a los antibióticos. Los genes que codifican las carbapenemasas con mayor relevancia clínica y epidemiológica tienen en su mayoría localización plasmídica, y se transfieren y expresan con facilidad en diversas especies de bacilos gramnegativos, y más frecuentemente, entre especies de enterobacterias. Por estas razones y debido a la rápida diseminación producida a nivel mundial durante los últimos años, se han convertido en un problema para los sistemas de salud muy trascendente que tiene especial repercusión a nivel hospitalario. En esta Tesis Doctoral se describe en detalle la expansión de la carbapenemasa tipo OXA-48 en el complejo Hospital Universitario La Paz-Cantoblanco durante los años 2010-2013.

## **1. La familia *Enterobacteriaceae***

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas que comprende más de 50 géneros y cientos de especies. Hasta 29 géneros distintos han sido aislados en muestras de origen humano (Tabla 1), pudiéndose distinguir entre patógenos primarios y colonizadores habituales del tracto gastrointestinal humano (1-3).

Tabla 1. Géneros y especies de enterobacterias comensales y patógenas aisladas en humanos.

Enterobacterias comensales		Patógenos primarios
<i>Averyella</i>	<i>Morganella</i>	<i>Escherichia coli</i> *
<i>Buttiauxella</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Shigella</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Photorhabdus</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Proteus</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>Providencia</i>	*Patotipos diarrogénicos: STEC ( <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga), ETEC ( <i>E. coli</i> enterotoxigénica), EPEC ( <i>E. coli</i> enteropatógena), EIEC ( <i>E. coli</i> enteroinvasiva), EAEC ( <i>E. coli</i> enteroagregativa) y patotipos extraintestinales: ExPEC ( <i>E. coli</i> patogénicas extraintestinales)
<i>Ewingella</i>	<i>Rahnella</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>Raoultella</i>	
<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	
<i>Hafnia</i>	<i>Shigella</i>	
<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	
<i>Kluyvera</i>	<i>Tatumella</i>	
<i>Leclercia</i>	<i>Yersinia</i>	
<i>Leminorella</i>	<i>Yokenella</i>	
<i>Moellerella</i>		

Las especies pertenecientes a esta familia son bacterias anaerobias facultativas, con forma de bacilos o cocobacilos y cuyo tamaño oscila entre 0,3-1  $\mu\text{m}$  por 0,6-6  $\mu\text{m}$ . No forman esporas y pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles (*Klebsiella*, *Enterobacter asburiae*, *Shigella*). Desde el punto de vista bioquímico se caracterizan por ser catalasa positiva, oxidasa negativa, reducen los nitratos a nitritos y son capaces de degradar la glucosa junto a una gran variedad de hidratos de carbono que han servido

tradicionalmente para la identificación bioquímica a nivel de especie. Su gran capacidad metabólica les permite utilizar numerosos sustratos como fuentes de energía, pudiendo crecer bien en los medios de cultivo habituales así como en los más pobres en nutrientes.

Algunas de las características estructurales de las enterobacterias constituyen importantes factores de virulencia como son la presencia de fimbrias, cápsula y el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular. La mayoría de las especies son capaces de producir fimbrias o pili que son responsables de la unión a otras bacterias y a las células del huésped; además hay especies que producen cápsula de naturaleza polisacáridica, ésta puede ser rígida y organizada o laxa y de límites mal definidos (glucocálix), y evita la activación del complemento y la fagocitosis. La pared celular de las enterobacterias, al igual que en otras bacterias gramnegativas, tiene una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos y proteínas que regulan el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, está constituida por el periplasma y la membrana externa. El periplasma contiene una capa delgada de peptidoglucano dentro de un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen LPS, lipoproteínas fijadas al peptidoglucano, proteínas multiméricas que forman porinas que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos, y otras proteínas de la membrana externa (Figura 1). El LPS está formado por un oligosacárido de repetición con capacidad antigénica conocido como antígeno O y una parte lipídica que constituye un importante factor de virulencia denominado lípido A o endotoxina.



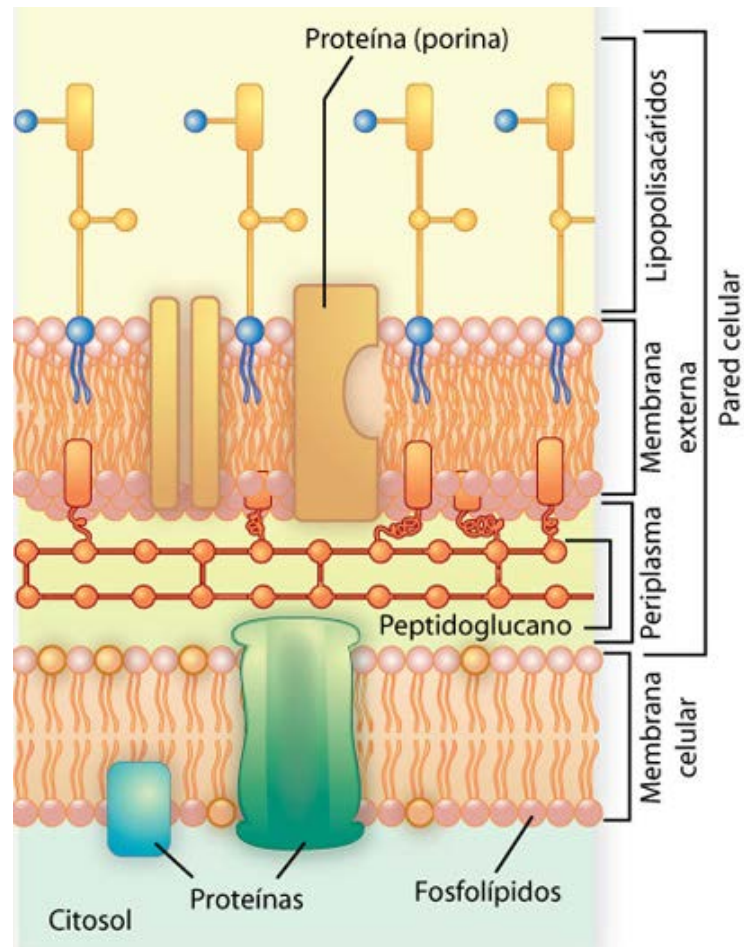


Figura 1. Estructura de la membrana celular y pared celular de enterobacterias.

Es muy frecuente entre las enterobacterias la presencia de elementos genéticos móviles: plásmidos, transposones y profagos que codifican nuevos antígenos, factores de virulencia (toxinas), rutas metabólicas alternativas y resistencia a antibióticos. Aunque la transferencia de genes cromosómicos (recombinación) es poco habitual entre las enterobacterias, la transferencia de elementos genéticos móviles es un fenómeno altamente frecuente tanto entre bacterias de la misma especie como entre géneros diferentes.

## 1.1. Epidemiología

La familia *Enterobacteriaceae* está ampliamente distribuida por el medio ambiente pudiéndose encontrar en suelo, plantas, medio acuático y tubo digestivo de animales y seres humanos. Las enterobacterias que colonizan al hombre forman parte en su mayoría de la flora gastrointestinal pero debemos recordar que su proporción relativa en la flora colónica es menor a un 0,1% (4). Las enterobacterias pueden colonizar de forma transitoria la mucosa periuretral pudiendo ascender a través de la uretra a la vejiga, y en algunos casos llegar a través del uréter hasta la pelvis renal. Son por tanto los agentes etiológicos más frecuentes de infección del tracto urinario a nivel comunitario en adultos y de infección urinaria asociada a catéter vesical (Tabla 2).

Tabla 2. Principales especies/grupos de enterobacterias productoras de infección del tracto urinario en España.

(Fuente: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>).

Infección urinaria comunitaria		Infección urinaria asociada a catéter	
Especie/grupo	%	Especie/grupo	%
<i>E. coli</i>	79,2	<i>E. coli</i>	35-40
<i>Proteus mirabilis</i>	4,3	<i>Klebsiella</i> spp, <i>P. mirabilis</i> , <i>Enterobacter</i> spp	15-20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,3	Otras enterobacterias	10
Otras enterobacterias	2,5		

Por otro lado, las enterobacterias comensales ocasionan patología en humanos cuando aparecen en el huésped factores que predisponen a la infección, comportándose como patógenos oportunistas. En una aproximación entre los múltiples factores predisponentes a la infección por enterobacterias comensales podemos distinguir dos tipos:

- Factores predisponentes locales: son los que facilitan la penetración microbiana por rotura de las barreras mucocutáneas, es el caso de heridas quirúrgicas o traumáticas, quemaduras, sondajes, catéteres y drenajes. También la presencia de material protésico, las patologías locales (litiasis, isquemia local) y algunas maniobras diagnósticas o terapéuticas (intubación).
- Factores predisponentes generales: en su mayoría son debidos a alteraciones directas o indirectas en el sistema inmune como ocurre en las enfermedades crónicas o sistémicas (diabetes, cirrosis, insuficiencia renal, enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes), inmunosupresión farmacológica en trasplantados y pacientes con neoplasias y en las edades extremas por falta de madurez (neonatos) o disfunción (ancianos) inmunitaria.

El conjunto de todos estos factores predisponentes hacen de las enterobacterias uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones nosocomiales y asociadas a los cuidados sanitarios. Los datos del Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España en el contexto del *European Prevalence Survey of Healthcare Associated Infections and Antimicrobial Use* en 2014 (EPINE-EPPS 2014) muestran que las enterobacterias son los microorganismos que se aíslan con más frecuencia tanto en las infecciones nosocomiales, como en las infecciones

de origen comunitario atendidas en los hospitales participantes en el estudio (Figura 2).

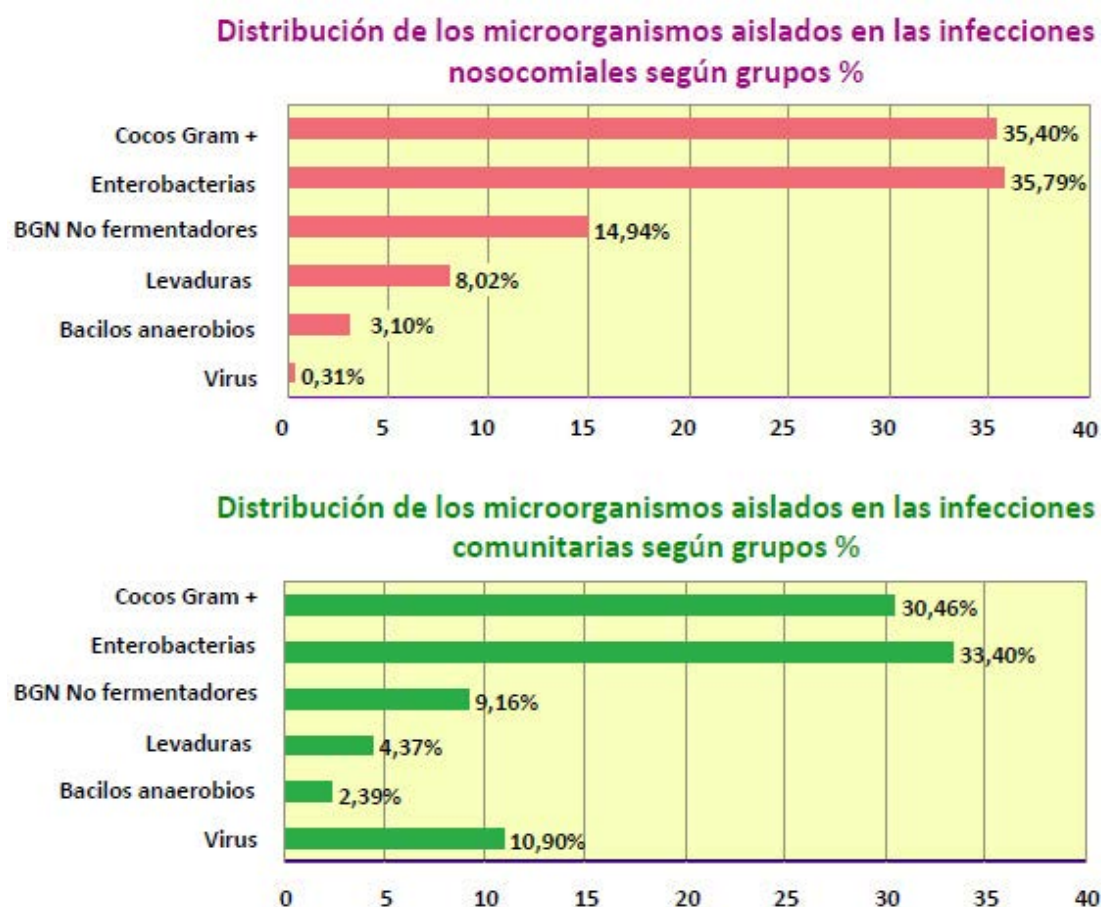


Figura 2. Distribución de los microorganismos aislados en las infecciones de origen nosocomial y comunitario obtenido del Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE) en el año 2014.

El informe del Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en los Servicios de Medicina Intensiva (ENVIN-UCI) de 2014 recoge una incidencia global intra-UCI de infecciones producidas por enterobacterias de un 37,7% (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos aislados en las principales infecciones intra-UCI. Datos obtenidos a partir del Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial de Servicios de Medicina Intensiva (ENVIN-UCI) en el año 2014.

	<b>Enterobacterias</b>	<b>BGN no enterobacterias</b>	<b>Grampositivos</b>	<b>Hongos</b>	<b>Virus</b>
Total infecciones (excluidas bacteriemias 2 <sup>rias</sup> )	37,7%	23%	29,7%	9,2%	0,3%
NAVM	34,8%	40,8%	21,6%	2,2%	0,6%
ITU sonda	50,7%	16,1%	17,2%	16%	-
Bacteriemias 1 <sup>rias</sup> y asociadas a catéter	22,9%	11,8%	56,5%	8,7%	-
Bacteriemias 2 <sup>rias</sup> a infección de otros focos	37,3%	25,4%	29,8%	7,5%	-

BGN: Bacilos gramnegativos.

## 1.2. Evolución temporal de la resistencia a los antibióticos betalactámicos

Desde que comenzaron a utilizarse los antibióticos de amplio espectro en las décadas de los años 50 y 60 para el tratamiento de bacterias gramnegativas, las enterobacterias han adquirido diversos mecanismos para evadir la acción de los antimicrobianos y en particular enzimas betalactamasas capaces de hidrolizar las penicilinas y las cefalosporinas. A mediados de los años 70 fueron comercializadas dos cefalosporinas estables a la acción de las betalactamasas: cefamandol y cefuroxima (5, 6), seguidos de la cefotaxima y ceftazidima a principios de los años 80 (7). A pesar de ello, enseguida emergieron en las enterobacterias betalactamasas de espectro extendido (BLEE) con actividad hidrolítica frente a estos nuevos

fármacos (8). Desde entonces las enterobacterias productoras de BLEE se han diseminado a nivel mundial y es frecuente la asociación de resistencia a otros antibióticos como fluorquinolonas y aminoglucósidos. En 1985 una nueva clase de antibióticos betalactámicos, los carbapenémicos, fueron introducidos en la práctica clínica. Los carbapenémicos se caracterizan por su amplio espectro y una gran estabilidad frente a las betalactamasas, incluidas las enterobacterias productoras de BLEE, siendo una de sus principales indicaciones el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de BLEE. Las primeras carbapenemasas identificadas en enterobacterias fueron obtenidas en Reino Unido en dos cepas de *Serratia marcescens* que habían sido aisladas en 1982. Estas enzimas, SME-1, eran del tipo serin-carbapenemasa y localización cromosómica (9). Sin embargo, las primeras carbapenemasas transferibles descritas en gramnegativos fueron de la clase metalobetalactamasa del tipo IMP en un aislados clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en Japón en 1991 (10) y posteriormente en éste mismo país en *S. marcescens* (11). En 2001 se describió la primera enterobacteria productora de carbapenemasa del tipo KPC-1 en Carolina del Norte (12), desde entonces se ha diseminado a otros estados de Estados Unidos, y a otros países, como Costa Rica, Colombia, y fundamentalmente a Israel y Grecia (13). A principios de 2003 se produjo una diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasa tipo VIM en hospitales de Grecia (14) junto con algunos brotes en hospitales de Francia (15) y España (16). Desde 2008 se han descrito continuas entradas a Europa de enterobacterias productoras de carbapenemasa tipo NDM-1 desde India a Reino Unido, Austria, Bélgica, Francia, Alemania, Holanda, Noruega y Suecia (17, 18). En 2006 se describieron los primeros casos de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el contexto de un brote en un

hospital de Turquía (19) con posterior diseminación a países de la cuenca mediterránea, África y Europa (20). Un aspecto importante a destacar es que con frecuencia las enterobacterias productoras de carbapenemasas son también portadoras de otras resistencias, tanto a beta-lactámicos, como a otros grupos de antibióticos, contribuyendo a la aparición de los fenómenos de multirresistencia, resistencia extrema o incluso panresistencia antibiótica (21).

Ante este panorama de incremento paulatino de las resistencias y especialmente de resistencias a los antibióticos utilizados como último escalón terapéutico, en abril de 2012 el ECDC puso en marcha el proyecto EuSCAPE (*European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) con el objetivo de obtener información sobre la epidemiología, incidencia y diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasa en 37 países de Europa e Israel. En el informe elaborado en 2013 sólo 3 países (Islandia, Montenegro y Macedonia) no informaron de casos de enterobacterias productoras de carbapenemasa, 21 países tuvieron un solo caso, casos esporádicos o brotes hospitalarios esporádicos mientras que en 11 países informaron de diseminación a nivel regional, de ellos, 3 (Grecia, Italia y Malta) tienen una situación endémica y en la mayoría de los hospitales tienen pacientes ingresados en los que se aíslan enterobacterias productoras de carbapenemasa (<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>). Este mismo informe recoge que España ha pasado de una situación epidemiológica de casos y brotes hospitalarios esporádicos en 2010, a una diseminación regional con casos relacionados epidemiológicamente entre distintos hospitales de un mismo área en 2013. En la figura 3 se muestra la situación

epidemiológica de las enterobacterias productoras de carbapenemasa en Europa y recogido en el informe EuSCAPE en 2013.

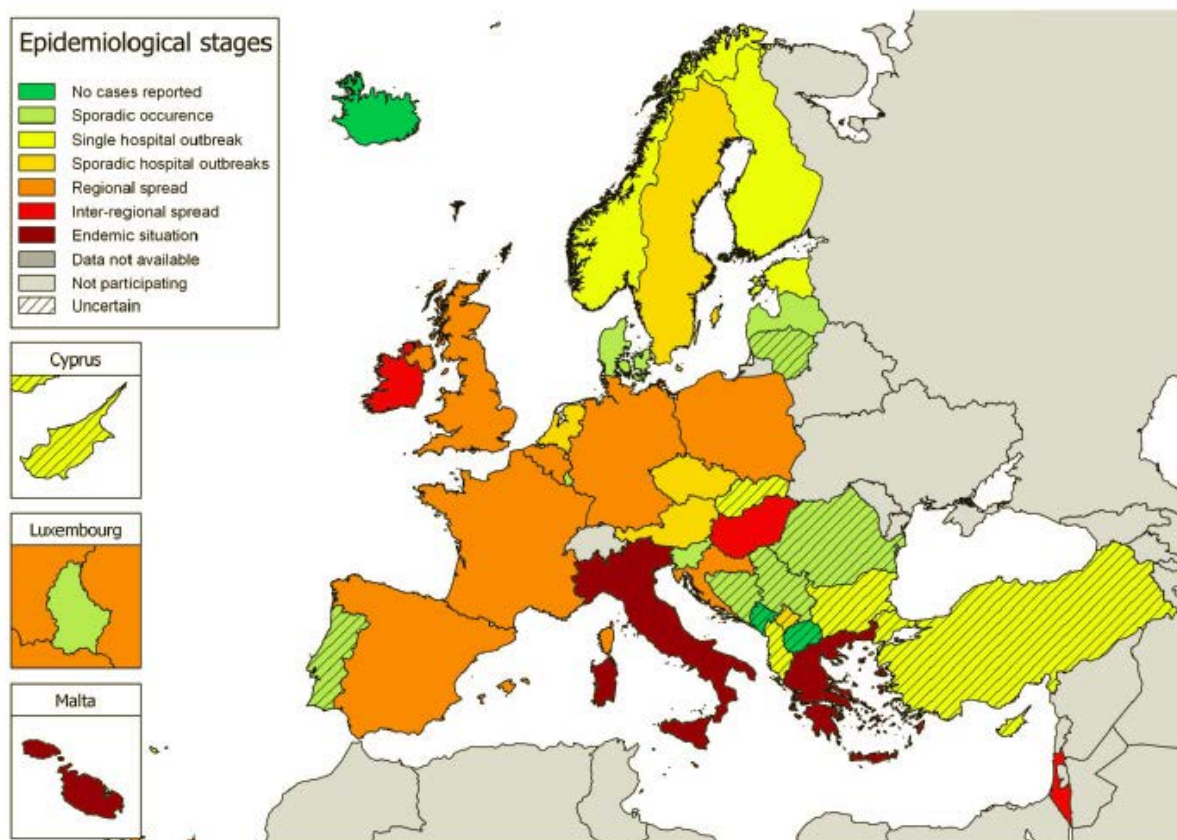


Figura 3. Mapa de incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasa en 38 países europeos en el año 2013 con datos obtenidos del informe EuSCAPE.

### 1.3. Factores de riesgo asociados con la colonización e infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa

Los factores de riesgo para la colonización o infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa son comunes a la de otros microorganismos nosocomiales como enterobacterias productoras de BLEE, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina o *Clostridium difficile*. En la tabla 4 se detallan los



factores de riesgo asociados con la colonización e infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa.

Tabla 4. Factores de riesgo vinculados a la colonización e infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa. Adaptado de Paño-Pardo y cols. (22).

Factores de riesgo
<b>Colonización previa con enterobacterias productoras de carbapenemasa</b>
<b>Tratamiento con antibióticos</b>
Betalactámicos de amplio espectro
Fluorquinolonas
Aminoglucósidos
Metronidazol
Vancomicina
Carbapenémicos
Tratamientos prolongados
<b>Enfermedad grave (índices APACHE y SOFA)</b>
<b>Comorbilidades</b>
Diabetes, tumores
Enfermedades neurológicas
Trasplante de órgano sólido o de precursores hematopoyéticos
Discapacidad funcional grave
Presencia de múltiples comorbilidades (índice de Charlson)
Niños: prematuridad y enterocolitis necrotizante
<b>Procedimientos invasivos</b>
Cirugía
Catéteres intravenosos y sondas vesicales
Ventilación mecánica
Traqueostomía
<b>Hospitalización</b>
Unidades de críticos
Traslados entre hospitales y unidades
Compartir habitación con un paciente colonizado
Estancias prolongadas
Estancias en residencias
<b>Viaje a zonas de elevada prevalencia</b>

APACHE: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*. SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*.

Los factores de riesgo están asociados con el tiempo y la frecuencia de exposición a los cuidados sanitarios, a los tratamientos antibióticos y a la predisposición individual frente a la infección (22).

## **2. Antibióticos carbapenémicos**

El origen de los carbapenémicos se remonta a 1979 cuando se publica el descubrimiento de la tienamicina, obtenida a partir de *Streptomyces cattleya*. Pese a su inestabilidad química, la tienamicina demostró tener el espectro antibacteriano más amplio dentro del grupo de los betalactámicos (23), por esta razón se desarrolló un derivado estable, la N-formimidoil tienamicina o imipenem.

### **2.1 Estructura química**

El anillo carbapenémico es un azobiciclo formado por la condensación de un anillo betalactámico y otro pirrolidínico con un enlace insaturado en posición 2 y 3. Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo con configuración *trans* que protege al anillo  $\beta$ -lactámico de muchas serino-betalactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 4).

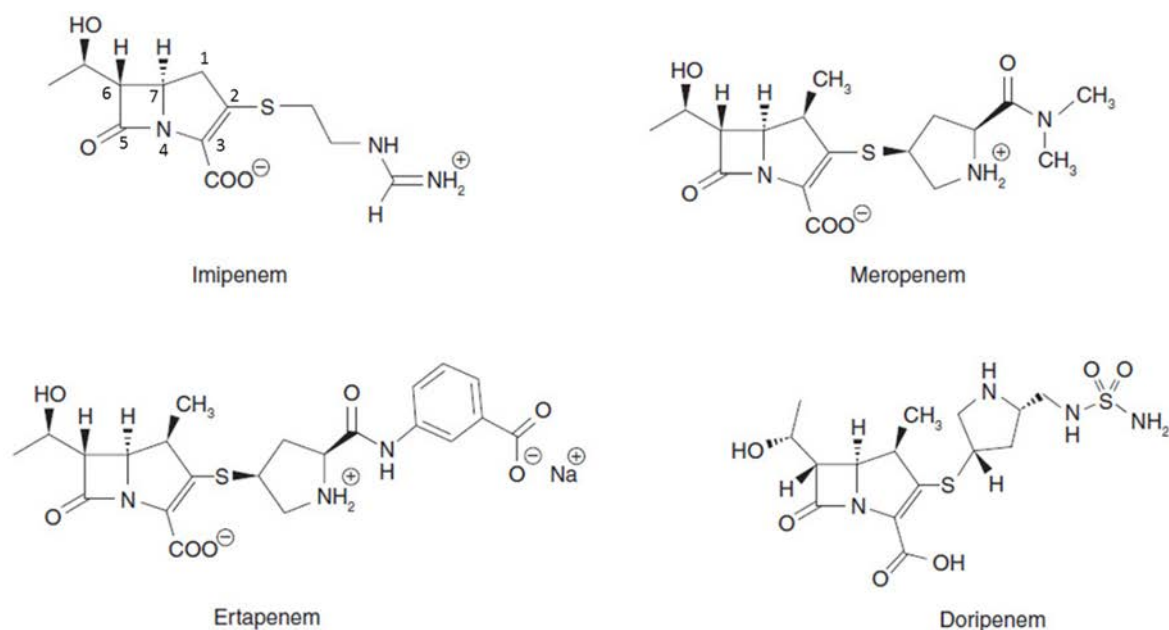


Figura 4. Estructura química de los antibióticos carbapenémicos utilizados en clínica. En el imipenem se indica la numeración del anillo azobiciclo.

Los distintos carbapenémicos son fruto de sustituciones en posiciones 1 y 2. En el imipenem los hidrógenos del carbono en posición 1 no están sustituidos, por lo que es sensible a la dehidropeptidasa I renal (DHP-I) y potencialmente nefrotóxico. En meropenem, ertapenem y doripenem en este carbono se ha introducido un grupo metilo (1-beta-metil-carbapenémicos) que les confiere estabilidad frente a la DHP-I. En posición 2, hay una cadena lateral tioacídica de carácter básico que diferencia a los distintos carbapenémicos y determina su actividad antimicrobiana, potencial neurotóxico, atrapamiento por algunas bombas de expulsión, farmacocinética y colabora en la estabilidad frente a la DHP-I. En ertapenem esta cadena lateral es un grupo que aumenta considerablemente la lipofilia y el tamaño de la molécula, lo que dificultaría su penetración a través de las porinas OprD y facilitaría su eliminación por las bombas de eflujo no alcanzando concentraciones adecuadas en el

espacio periplásmico de *P. aeruginosa*. Imipenem, meropenem y doripenem tienen un menor peso molecular, son hidrofílicos y de estructura compacta y zwitteriónica, lo que permite una penetración rápida a través de las porinas de los gramnegativos (24).

## 2.2. Mecanismo de acción

Al igual que el resto de antibióticos betalactámicos, inhiben la síntesis de la pared bacteriana durante la transpeptidación uniéndose a residuos de serina del centro activo de enzimas transpeptidasas, situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática (denominadas también PBPs (*Penicillin Binding Proteins*, proteínas que fijan penicilinas). Para ejercer su acción deben atravesar la pared celular para acceder a las PBPs, lo que es fácil en grampositivos pero más complicado en gramnegativos, aunque gracias a sus características estructurales pueden acceder a las PBPs de las bacterias gramnegativas a través de las porinas de la membrana externa. Las transpeptidasas actúan en la última fase de la síntesis de la pared bacteriana que consiste en el entrecruzamiento de diferentes cadenas de peptidoglucano mediante enlaces entre las cadenas peptídicas laterales. Este paso empieza con la formación de tetrapéptidos a partir de pentapéptidos con la pérdida de uno de los aminoácidos terminales que están fijados al ácido N-acetilmurámico. El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido a la que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente y bloquear su actividad (Figura 5).

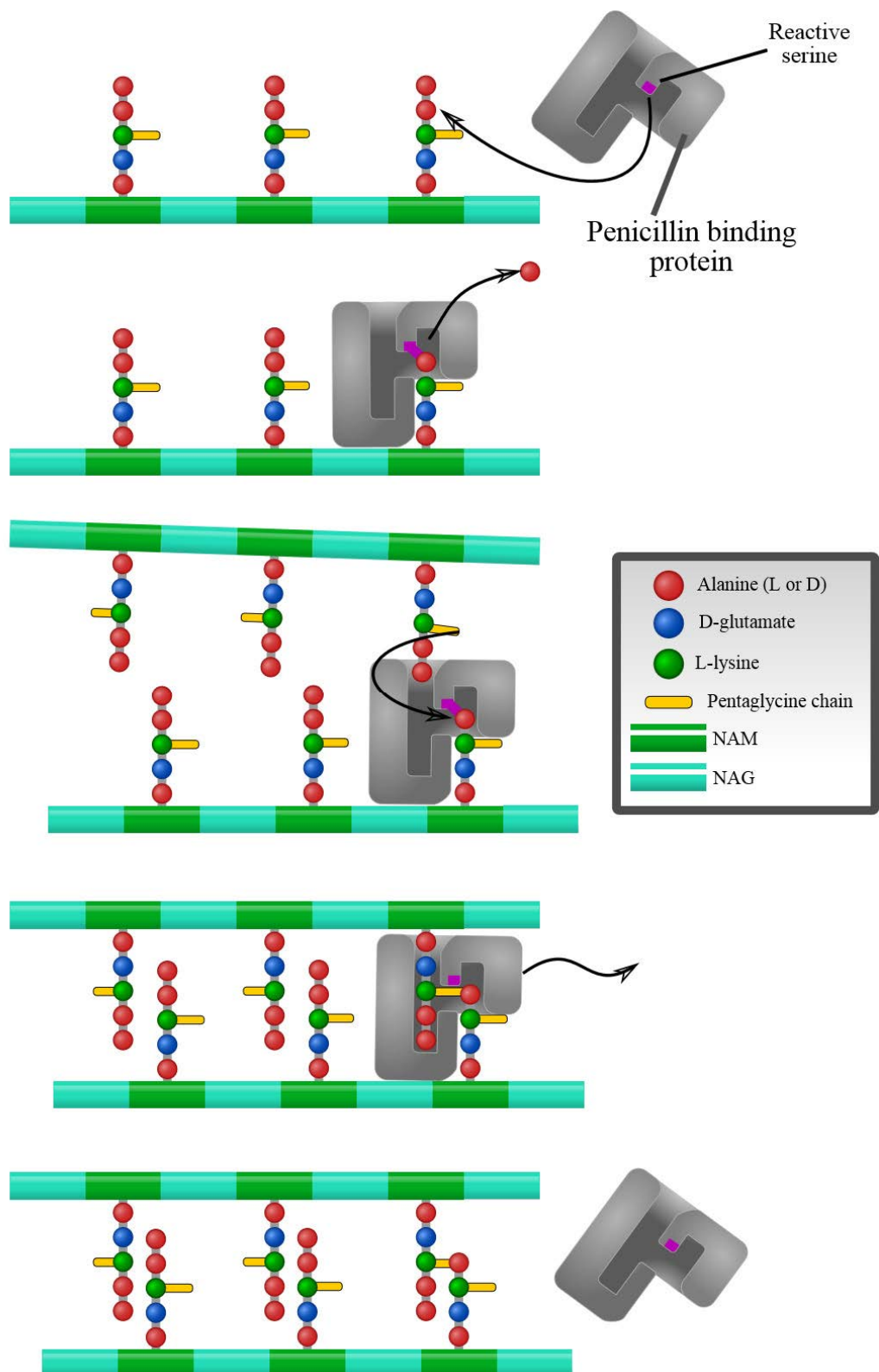


Figura 5. Esquema de la actividad transpeptidasa de las PBPs en la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana.

Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano, siendo el resultado final la debilitación de la pared bacteriana y la lisis bacteriana. Por todo ello se comportan habitualmente como antibióticos bactericidas (24, 25). Los carbapenémicos muestran una elevada afinidad por múltiples PBP fundamentales en gramnegativos, especialmente por las PBP de alto peso molecular 1a, 1b, 2 y 3. La mayor afinidad por las PBP-1a y 1b, en comparación con otros betalactámicos, determina un mayor y más rápido efecto bactericida. En general, el espectro de afinidad por las PBP es similar aunque la preferencia por algunas de ellas, principalmente las PBP-2 y 3, determina los diferentes matices de actividad intrínseca y potencia antimicrobiana de cada carbapenémico (26).

### 2.3. Espectro y actividad antimicrobiana

Los antibióticos carbapenémicos poseen un espectro de actividad muy amplio (Tabla 5), determinado por: la capacidad de penetrar a través de la pared de los gramnegativos, la alta afinidad por las PBP esenciales de muchas especies y la elevada resistencia a muchas betalactamasas de grampositivos y gramnegativos (24).

Son resistentes de forma natural los estafilococos resistentes a meticilina, *Enterococcus faecium*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum* y bacterias productoras de metalobetalactamasas cromosómicas, como *Flavobacterium* spp., *Myroides odoratum*, *Chryseobacterium* spp., *Elizabethkingia meningoseptica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingobacterium multivorum*, *Legionella gormanii*, *Bacillus cereus*, *Janthinobacterium lividum* y algunos aislamientos de *Aeromonas* spp.

	Grampositivos	Gramnegativos
<b>Aerobios y anaerobios facultativos</b>	<i>S. aureus</i> sensibles a meticilina	Enterobacterias
	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa sensibles a meticilina	<i>Acinetobacter</i> spp.
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Achromobacter</i> spp.
	Estreptococos del grupo <i>viridans</i>	<i>Roseomonas</i> spp.
	<i>Enterococcus faecalis</i> *	<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Brucella</i> spp.
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Neisseria</i> spp.
	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Moraxella</i> spp.
	<i>Tsukamurella</i> spp.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Actinomadura madurae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Streptomyces</i> spp.	
<b>Microaerófilos</b>		<i>Campylobacter jejuni</i>
		<i>Campylobacter</i> spp.
		<i>Helicobacter pylori</i>
		<i>Capnocytophaga</i> spp.
<b>Anaerobios</b>	Cocos grampositivos	<i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i>
	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.
	<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Porphyromonas</i> spp.
	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.
	<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>Veillonella</i> spp.
	<i>Eubacterium</i> spp.	

\* Sólo imipenem y doripenem

Tabla 5. Espectro de actividad de los antibióticos carbapenémicos.

Frente a enterobacterias todos los carbapenémicos poseen una elevada actividad intrínseca aunque doripenem es similar o ligeramente superior a meropenem y ertapenem. En términos de CMI<sub>90</sub> doripenem, meropenem y ertapenem son similares y aproximadamente 4 veces más activos que imipenem. Meropenem y ertapenem son más activos que doripenem frente a *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. y *Salmonella* spp.

Todos los carbapenémicos son estables frente a la mayoría de las betalactamasas clínicamente significativas (BLEE y AmpC), pero hay diferencias entre ellos. La producción de BLEE no suele traducirse en un aumento significativo de CMI excepto en el caso de ertapenem. Este hecho puede suponer, aunque no necesariamente, resistencia a este último manteniéndose la sensibilidad al resto (27). En un amplio estudio de vigilancia de la sensibilidad realizado en el ámbito mundial se observaron CMI<sub>90</sub> de todos los carbapenémicos más elevadas en *K. pneumoniae* productoras de BLEE que en cepas que no poseen este fenotipo (1-4 µg/ml frente a ≤0,06-≤0,5 µg/ml) (28). Frente a cepas de *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. y *S. marcescens* resistentes a ceftazidima por producción de AmpC, doripenem es dos veces más activo que meropenem y de 8 a 32 veces más activo que imipenem o ertapenem. Las cepas de *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter* spp. con resistencia mediada por producción de AmpC poseen CMI<sub>90</sub> frente a doripenem y meropenem cuatro veces superiores a las de las cepas salvajes, aunque se mantiene dentro de los rangos de sensibilidad. El aumento de la CMI de ertapenem por hiperproducción de AmpC es más manifiesto y no es infrecuente la aparición de enterobacterias resistentes a ertapenem (Tabla 6).



Tabla 6. Intervalos de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los carbapenémicos frente a enterobacterias sin mecanismos de resistencia añadidos y con BLEE o AmpC. Adaptado de Fresnadillo-Martínez y cols. (24).

	<b>Imipenem</b>	<b>Meropenem</b>	<b>Ertapenem</b>	<b>Doripenem</b>
<i>E. coli</i>	0,25-0,5	0,03- $\leq$ 0,12	$\leq$ 0,01- $\leq$ 0,06	$\leq$ 0,01- $\leq$ 0,06
<i>E. coli</i> BLEE	$\leq$ 0,5-1	$\leq$ 0,06- $\leq$ 0,12	0,25	0,03- $\leq$ 0,06
<i>K. pneumoniae</i>	$\leq$ 0,06-1	$\leq$ 0,06-0,25	0,03-0,25	0,03-0,12
<i>K. pneumoniae</i> BLEE	0,25-1	0,12-1	0,25-4	0,06-1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,25- $\leq$ 0,5	$\leq$ 0,06- $\leq$ 0,12	0,03- $\leq$ 0,06	$\leq$ 0,06
<i>K. oxytoca</i> BLEE	$\leq$ 0,5	$\leq$ 0,12	0,25	0,12
<i>E. cloacae</i>	0,5-2	0,06-0,12	0,12-1	$\leq$ 0,06-0,12
<i>E. cloacae</i> AmpC	1-2	0,5	2	0,25-0,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0,06- $\leq$ 0,12	0,12-0,5	0,12-0,25
<i>E. aerogenes</i> AmpC	2	0,5	4	0,5
<i>Citrobacter spp.</i>	0,12-2	0,03- $\leq$ 0,12	0,03-0,25	0,03-0,06
<i>Citrobacter spp.</i> AmpC	1-2	$\leq$ 0,12-0,25	0,5	0,06-0,12
<i>S. marcescens</i>	1-4	$\leq$ 0,12-0,25	$\leq$ 0,06-0,12	0,12-0,5
<i>S. marcescens</i> AmpC	1-4	0,25-0,5	1-2	0,25-0,5
<i>P. mirabilis</i>	0,5-2	$\leq$ 0,06-0,25	$\leq$ 0,01- $\leq$ 0,06	0,25-1
<i>P. mirabilis</i> BLEE	2-8	0,12	0,03	0,06-0,25
<i>Proteus vulgaris</i>	2-4	$\leq$ 0,12-0,5	$\leq$ 0,06	0,25-0,5
<i>Morganella morganii</i>	4	$\leq$ 0,12-0,25	$\leq$ 0,06	0,5
<i>M. morganii</i> AmpC	4	0,25	$\leq$ 0,06	0,5
<i>Providencia spp</i>	2	0,12	$\leq$ 0,06	0,25-0,5
<i>Salmonella spp</i>	0,25-0,5	0,03- $\leq$ 0,06	$\leq$ 0,01- $\leq$ 0,06	0,06-0,12
<i>Shigella spp</i>	0,12-0,25	0,03- $\leq$ 0,06	$\leq$ 0,01- $\leq$ 0,06	0,03-0,06

## 2.4. Farmacocinética

Las propiedades farmacocinéticas de los carbapenémicos comercializados actualmente se recogen en la tabla 7. Los parámetros de meropenem e imipenem son semejantes, y para imipenem la farmacocinética intramuscular es similar a la intravenosa. Los carbapenémicos penetran de forma adecuada en la mayor parte de los fluidos y tejidos corporales aunque el acceso de imipenem y ertapenem a líquido ceforraquídeo (LCR) es limitado. En las meningitis, meropenem alcanza valores superiores a las CMI de los agentes etiológicos más habituales. Todos se eliminan por hemodiálisis, aunque la cilastatina no completamente.

Tabla 7. Características farmacocinéticas de los antibióticos carbapenémicos.

	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Doripenem
Dosis i.v. (gr)	1	1	1	0,5
Posología*	500 mg-1 g/6-8 h	500 mg-2 g/6-8 h	1 g/12-24 h	500 mg/8 h
C <sub>max</sub> (mg/l)	69,9	61,6	164,6	23
t <sub>1/2</sub> (h)	1,11	0,98	4	1
Vd (l)	14,4	12,5	9,8	16,8
AUC (mg/h/l)	92,5	90,8	577,1	36
Unión a proteínas (%)	20	2	85-95	9
Recuperación urinaria (%)	74	75	80-95	71
Estabilidad (temperatura ambiente) en solución acuosa (h)	4	6	6	12

\*La posología indicada es la más habitual para adultos y con función renal normal. Puede variar en función de la indicación.

AUC: área bajo la curva; C<sub>max</sub>: concentración plasmática máxima; i.v.: intravenoso;

t<sub>1/2</sub>: semivida plasmática; Vd: volumen de distribución.

## 2.5. Características farmacocinéticas-farmacodinámicas (PK/PD)

Los carbapenémicos, como el resto de los betalactámicos, son antimicrobianos con actividad dependiente del tiempo. Por este motivo, un parámetro de valoración de eficacia clínica es el denominado "tiempo por encima de la CMI" ( $T > CMI$ ), es decir, el tiempo (en porcentaje) del intervalo de dosificación en el que la concentración de antimicrobiano supera a la CMI de las bacterias diana. Por su elevado poder bactericida, efecto postantibiótico y elevada afinidad por las PBP, los carbapenémicos requieren un  $T > CMI$  menor que otros betalactámicos. Se ha sugerido que  $T > CMI$  del 20% (el 30% en penicilinas y el 40% en cefalosporinas) son suficientes para lograr un efecto bacteriostático y  $T > CMI$  del 30-40% (el 50% en penicilinas y el 60-70% en cefalosporinas) son adecuados para garantizar un efecto bactericida máximo. Meropenem e imipenem tienen una probabilidad cercana al 100% de superar el 40% del  $T > CMI$  mientras que en ertapenem esta probabilidad es ligeramente inferior, del orden del 94%. Los carbapenémicos son los antibióticos de elección en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias productoras de BLEE, por esta razón, prever la eficacia en infecciones causadas por cepas productoras de BLEE es especialmente importante. En cepas productoras de BLEE meropenem e imipenem muestran probabilidades de alcanzar valores de  $T > CMI$  del 40% similares a las obtenidas en cepas no productoras, mientras que ertapenem no supera el 78%. Doripenem muestra una probabilidad del 99-100% de alcanzar valores de  $T > CMI$  del 35 % (24). Atendiendo a este parámetro, la eficacia terapéutica puede mejorarse utilizando dosis más elevadas, disminuyendo el intervalo terapéutico o prolongando el tiempo de perfusión sin incrementar la dosis. En este sentido, se ha demostrado que la eficacia clínica de meropenem es idéntica con 500 mg/6 h y con 1 g/8 h y

que el aumento del tiempo de perfusión de doripenem (posible por su mayor estabilidad), sin aumentar el número de dosis ni la cantidad total de antimicrobiano, incrementa el T>CMI. Además, se ha demostrado que la disminución del intervalo terapéutico ofrece una mayor seguridad de alcanzar un T>CMI prologado y un mayor poder bactericida que la utilización de dosis elevadas (24).

## 2.6. Indicaciones clínicas

Por el amplio espectro de actividad y especiales características farmacocinéticas, imipenem y meropenem están indicados en el tratamiento de infecciones nosocomiales graves. Son los antimicrobianos de elección en el tratamiento empírico de infecciones en las que se sospecha la implicación de microorganismos productores de BLEE o de AmpC que desarrollan resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, y en pacientes que han recibido previamente antimicrobianos de amplio espectro por la posibilidad de haber seleccionado cepas multirresistentes. También son de elección en infecciones complicadas de etiología polimicrobiana o mixta.

Imipenem y meropenem son efectivos, bien en monoterapia o asociados a otros antimicrobianos, en el tratamiento nosocomial de bacteriemias y sepsis, infecciones graves de piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, infecciones intraabdominales (no indicado en las de adquisición comunitaria), infecciones urinarias complicadas, infecciones ginecológicas complicadas, y en la neumonía nosocomial grave. La mayor actividad de meropenem frente a *Pseudomonas* spp. determina que sea el fármaco de elección en la fibrosis quística y en el paciente neutropénico febril. Está indicado en el tratamiento de meningitis en niños

y adultos, en especial en meningitis nosocomiales producidas por *Pseudomonas* spp. y bacilos gramnegativos resistentes a otros antimicrobianos. Algunos trabajos han demostrado su eficacia en meningitis por *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y cefalosporinas de tercera generación. La alta incidencia de convulsiones asociadas a imipenem limita su uso en esta indicación.

Ertapenem presenta un espectro más reducido que no incluye patógenos nosocomiales relevantes como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., lo que relega su uso al tratamiento de infecciones leves o moderadas adquiridas en la comunidad que precisan ingreso hospitalario. Las indicaciones aprobadas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) son: neumonía adquirida en la comunidad, infecciones intraabdominales, infecciones ginecológicas agudas, infecciones del pie diabético que afectan a piel y partes blandas y profilaxis de infecciones en herida quirúrgica después de cirugía colorrectal programada en adultos. No se ha establecido su eficacia en el tratamiento de las neumonías adquiridas en la comunidad producidas por *S. pneumoniae* resistentes a penicilina, ni en las infecciones de pie diabético asociadas a osteomielitis. Aunque es un antibiótico de uso hospitalario, constituye una alternativa para los pacientes subsidiarios de tratamiento parenteral ambulatorio por su buena tolerancia y su cómoda dosificación. A pesar de existir una formulación i.m., en España sólo está aprobada la presentación i.v.

Doripenem es el último carbapenem introducido en clínica, aprobado por la EMA para el tratamiento de infecciones intraabdominales complicadas, infecciones complicadas del tracto urinario, y pielonefritis y neumonías nosocomiales incluidas las asociadas a ventilación mecánica.

### **3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos en enterobacterias**

La aparición de resistencias a los carbapenémicos en enterobacterias puede producirse por dos mecanismos:

- A. Disminución en la expresión o funcionalidad de las porinas de membrana externa, que dificulta la penetración del antibiótico en el espacio periplásmico, junto con la sobreexpresión de betalactamasas que poseen baja afinidad por los carbapenémicos.
- B. Adquisición de genes que codifican enzimas capaces de degradar los carbapenémicos.

#### **3.1. Mecanismos de resistencia no mediados por carbapenemasas**

La membrana externa de las bacterias gramnegativas contiene unas proteínas llamadas porinas que forman canales hidrofílicos para permitir la entrada selectiva de nutrientes y otros compuestos como los antibióticos. Las porinas implicadas en la entrada de antibióticos en enterobacterias pertenecen a las familias OmpF o OmpC y cambios en el número o funcionalidad de estas proteínas pueden tener efectos en la susceptibilidad a los antibióticos (29). Estos cambios incluyen: mutaciones en la puerta de entrada o en la porción central del canal, disminución en la cantidad de proteína o cambios en el tipo de porinas que se expresan (*shift*). La síntesis de las porinas puede regularse en respuesta a diversos compuestos con actividad antibiótica vía cascadas de expresión en los que están implicados los operones *mar* y *sox* con la consiguiente disminución en el número de porinas en la membrana externa (30). En la familia *Enterobacteriaceae*, la resistencia a los carbapenémicos se observó por primera vez en cepas que presentaban una sobreexpresión de los genes que codifican para la

cefalosporinasa AmpC cromosómica, fundamentalmente en *Enterobacter* spp., junto con modificaciones en las porinas OmpC y OmpF. Mecanismos de resistencia similares también se han descrito en *Serratia* spp., *C. freundii* y *M. morganii*; al igual que en otras especies de enterobacterias que carecen de cefalosporinasas cromosómicas como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp. En estos casos la resistencia se produce por la combinación de la expresión de AmpC plasmídicas junto con la disminución de la permeabilidad debido a modificaciones en OmpK35/36 en *K. pneumoniae*, OmpF y OmpC en *E. coli*, y en OmpF en *Salmonella typhimurium* (31, 32). En estos casos la selección de aislados resistentes o con sensibilidad disminuida se produce en el curso del tratamiento con carbapenémicos.

De forma similar, la producción de BLEE en combinación con déficits en la permeabilidad de membrana puede producir la aparición de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias. Este mecanismo se ha descrito para casi todas las especies de enterobacterias incluyendo *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Enterobacter* spp. Recientemente se han descrito aislados de *K. pneumoniae* productora de BLEE y resistente a ertapenem portadoras de una nueva variante de porina OmpK32 (OmpK32 V) que contribuye a la resistencia a ertapenem junto con sensibilidad disminuida a meropenem y sensible a imipenem (33). La identificación de aislados resistentes a ertapenem es un fenómeno emergente como consecuencia de la diseminación mundial de aislados productores de BLEE CTX-M de adquisición comunitaria (34). Finalmente, la sobreexpresión del componente de las bombas de expulsión AcrA se ha descrito como responsable de la resistencia a imipenem en *E. aerogenes* (35).

En general, la resistencia a los carbapenémicos en aislados con defectos en las porinas es inestable y las deficiencias en la permeabilidad

de la membrana externa producen como consecuencia una disminución en la capacidad de replicación o *fitness*. Además, las cepas que son resistentes a carbapenémicos no productoras de carbapenemasa son habitualmente menos resistentes a antibióticos de otras familias y la resistencia a carbapenémicos no es transferible, por tanto estos mecanismos son considerados de menor trascendencia epidemiológica que los aislados productores de carbapenemasa.

### 3.2. Mecanismos de resistencia mediados por carbapenemasas

Las carbapenemasas, como el resto de betalactamasas, actúan hidrolizando el anillo betalactámico con posterior descarboxilación del producto intermedio, originando la inactivación de las propiedades antibacterianas de la molécula (Figura 6).

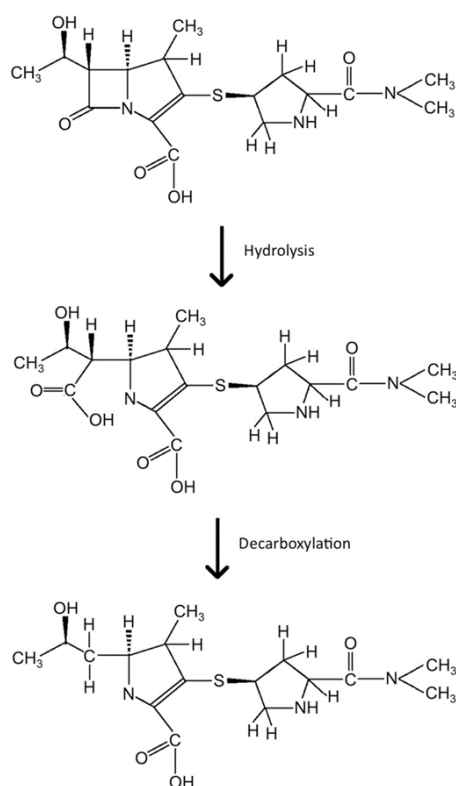


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis del anillo betalactámico mediado por enzimas con actividad carbapenemasa.



En enterobacterias se han identificado una gran variedad de carbapenememasas pertenecientes a tres clases moleculares en función de la clasificación de las betalactamasas de Ambler: Clase A, B y D (Tabla 8).

Tabla 8. Clases y características de las carbapenememasas más prevalentes en enterobacterias.

Clase de Ambler (Subclase)	Grupo funcional Bush-Jacoby	Centro activo	Enzima	Localización
<b>A</b>	2f	Serina	SME-1 hasta 3	Cromosómica
			NMC-A	Cromosómica
			IMI-2	Plasmídica
			GES-4 hasta 6	Plasmídica
			KPC-1 hasta 12	Plasmídica
<b>B (B1)</b>	3a	Zn <sup>2+</sup>	IMP-1 hasta 33	Plasmídica
			VIM-1 hasta 33	Plasmídica
			NDM-1 hasta 7	Plasmídica
			KHM-1	Plasmídica
<b>D</b>	2df	Serina	OXA-48	Plasmídica
			OXA-181	Plasmídica

Las carbapenememasas, además de los carbapenémicos, también hidrolizan otros betalactámicos y dependiendo del tipo de carbapenemasa se observan variaciones en su espectro de actividad hidrolítica así como en los inhibidores (Tabla 9).

Tabla 9. Espectro de actividad e inhibidores de las carbapenemasas más prevalentes en enterobacterias.

Enzima	Hidrólisis						Inhibidores
	Penicilinas	CF1G	CF2G	CF3G	Aztreonam	Carbapenémicos	
SME	++	++	-	+	+	+	Ácido clavulánico Tazobactam Sulbactam
NMC	++	++	-	+	-	++	
IMI							
GES	++	++	+	+	-	+	Ácido clavulánico Tazobactam Sulbactam Ácido borónico
KPC	++	++	+	++	+	++	
IMP	++	++	++	++	-	++	
VIM							
KHM							EDTA Ácido dipicolínico
NDM	++	++	++	++	-	+	
OXA-48	++	++	+/-	+/-	-	+	NaCl
OXA-181							

CF1G: Cefalosporinas de 1ª generación. CF2G: Cefalosporinas de 2ª generación. CF3G: Cefalosporinas de 3ª generación.

Algunas cefalosporinasas muy poco frecuentes de localización cromosómica (clase C de Ambler o AmpC) y producidas por enterobacterias, poseen cierta actividad ampliada a los carbapenémicos, aunque su significación clínica está en debate (36).

### 3.2.1. Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de clase A tienen capacidad de hidrolizar una amplia variedad de betalactámicos entre los que se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y aztreonam. Dentro de las carbapenemasas de clase A, las que tienen una mayor trascendencia clínica e importancia epidemiológica son las denominadas KPC (20), que reciben este nombre por haberse aislado inicialmente en *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas KPC hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Como excepción tendrían una menor tasa de hidrólisis de las cefamicinas (cefexitina) aunque los valores de CMI que se obtienen suelen estar por encima del punto de corte de sensibilidad. Son parcialmente inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, no se inhiben por el EDTA pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para el reconocimiento fenotípico. No obstante, la inhibición por el ácido borónico no es exclusiva de las enzimas KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las betalactamasas de tipo AmpC (Clase C de Ambler y grupo 1 de Bush-Jacoby). La primera de estas enzimas KPC se describió en la costa este de los Estados Unidos en 1996 (12) para posteriormente diseminarse por todo el país y después en otras áreas geográficas como Colombia y Puerto Rico (37) en pacientes que previamente habían estado ingresados en este país y que habrían dado lugar a brotes importantes como el ocurrido en Israel (38). También se ha aislado en numerosos países de Europa, fundamentalmente en Grecia e Italia (39), y en China (40). Son de naturaleza plasmídica asociadas al trasposón Tn4401. Asimismo, y aunque no de manera exclusiva, se han encontrado mayoritariamente ligadas a las cepas de secuencia tipo (ST) 258 de *K. pneumoniae*. Las enzimas

KPC se han descrito no solo en *Enterobacteriaceae* sino también en *P. aeruginosa* y en *Acinetobacter baumannii*. En España su aparición ha sido más tardía y no está asociada al clon ST258 (41).

### 3.2.2. Carbapenemasas de clase B

Las carbapenemasas de clase B o metalobetalactamasas tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos betalactámicos con la excepción del aztreonam y no son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam. Su capacidad de hidrólisis es dependiente de la interacción del betalactámico con el catión  $Zn^{2+}$  en el sitio activo, por esta razón son inhibidas por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, el ácido 2-mercaptopropiónico, o el ácido dipicolínico. Las metalobetalactamasas de origen adquirido que con más frecuencia se encuentran en enterobacterias son del tipo IMP, VIM y recientemente las del tipo NDM (42). Las de tipo KHM-1 son muy infrecuentes y se han descrito en Japón en un aislado clínico de *C. freundii* obtenido en 1997 (43).

Hasta el momento se han descrito 33 variantes de carbapenemasas de tipo IMP que se han diseminado desde Japón a Taiwan, el este de China y más recientemente a Grecia (44). Los genes *bla*<sub>IMP</sub> forman parte de integrones de clase 1 que contienen casetes de genes que codifican para varios mecanismos de resistencia no relacionados y que se expresan a partir de un mismo promotor. Los integrones de clase 1 no tienen capacidad de movilizarse por sí mismos pero normalmente forman parte de trasposones que permiten su diseminación.

Las carbapenemasas de tipo VIM también forman parte de un casete de genes dentro de integrones de clase 1 y se conocen 33 variantes.

La variante de tipo VIM-2 es la más frecuente y la más extendida con una distribución endémica en el sur de Europa y el sudeste asiático (45).

Descrita en 2008 en Suecia en un paciente procedente de Nueva Dehli (18), la carbapenemasa de tipo NDM han sido centro de atención mediática debido a su rápida diseminación y su perfil de multirresistencia o panresistencia. La mayoría de los pacientes infectados o colonizados por NDM-1 habían viajado o tenían relación con India, Pakistán o Bangladesh por lo que estos países son considerados el principal reservorio de genes *bla*<sub>NDM-1</sub>. También se han descrito casos de pacientes relacionados con los estados de la península balcánica y países del medio este, considerándose estas áreas un reservorio secundario de NDM-1 (46, 47). Los genes de *bla*<sub>NDM-1</sub> no están asociados con un solo clon, especie o plásmido, se han descrito en una gran variedad de especies de bacilo gramnegativos, siendo la mayoría especies de enterobacterias, que contienen plásmidos de diferentes tipos (48). La mayoría de las cepas productoras de NDM-1 expresan otros genes de resistencia no relacionados, como otros tipos de carbapenemasas (OXA-48, VIM), cefalosporinasas AmpC, BLEE, resistencias a aminoglucósidos (metilasas de ARN 16S), macrólidos (estearasas), rifampicina y sulfametoxazol; siendo muchos de los aislados productores de NDM-1 sólo sensibles a tigeciclina, colistina o fosfomicina (49). Aunque la mayoría de las cepas productoras de NDM-1 son de origen nosocomial siendo la especie más frecuente *K. pneumoniae*, también se han descrito en aislados de *E. coli* de origen comunitario (31). En un estudio realizado en aguas residuales y aguas de abastecimiento en Nueva Delhi se encontraron aislados productores de NDM-1 en muchas especies de bacilos gramnegativos, incluyendo especies de origen ambiental como *Vibrio*

*cholerae*; estos datos indican que, al menos en India, existe una gran diseminación medioambiental (50).

### 3.2.3. Carbapenemasas de clase D

Las betalactamasas de clase D, también denominadas oxacilinasas por su capacidad en hidrolizar la oxacilina y la penicilina, comprenden 232 enzimas de las que sólo unas pocas poseen actividad carbapenemasa. Con la excepción de la OXA-163, las betalactamasas de clase D con actividad carbapenemasa no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido y en general tienen una actividad carbapenemasa débil, que no se inhibe por el ácido clavulánico, ácido borónico ni agentes quelantes como el EDTA, aunque sí por el NaCl y, a diferencia de las carbapenemasas de clase A y las betalactamasas de clase C, presentan una elevada resistencia a temocilina (51). La mayoría de las betalactamasas de clase D con actividad carbapenemasa se han descrito en el género *Acinetobacter* a excepción de la carbapenemasa OXA-48 que se ha descrito casi de manera exclusiva en especies de la familia *Enterobacteriaceae*. La primera enterobacteria productora de OXA-48 se identificó en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en el año 2001 y procedente de Turquía (52), desde entonces se han descrito brotes nosocomiales en Turquía, sur de Europa y África (20, 53). En 2011 se describieron los primeros casos de enterobacterias en India o pacientes que habían tenido relación con este país, de aislados con una variante de OXA-48 que conserva las mismas propiedades hidrolíticas y sólo de ésta en una mutación puntual, a esta variante se le conoce como OXA-181 (54, 55).

#### 4. Carbapenemasas del tipo OXA-48 y “OXA-48 like”

El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> está localizado en un transposón: Tn1999, que está constituido por 2 copias de la secuencia de inserción IS1999 flanqueando al gen de carbapenemasa. Las secuencias de inserción además de permitir la movilización del gen por transposición regulan su expresión a través de un promotor (56). Otro elemento genético que contiene el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> es el Tn1999.2 que difiere del anterior por la presencia de una secuencia de inserción IS1R dentro de Tn1999 localizada en dirección 5' (Figura 7). El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> está albergado en un plásmido conjugativo IncL/M de 62 Kb cuyo gen *tir* está truncado por el Tn1999, este gen codifica una proteína inhibidora de la conjugación bacteriana, lo que conduce a un incremento en la frecuencia de conjugación plasmídica y a la eficiente diseminación del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> (57).

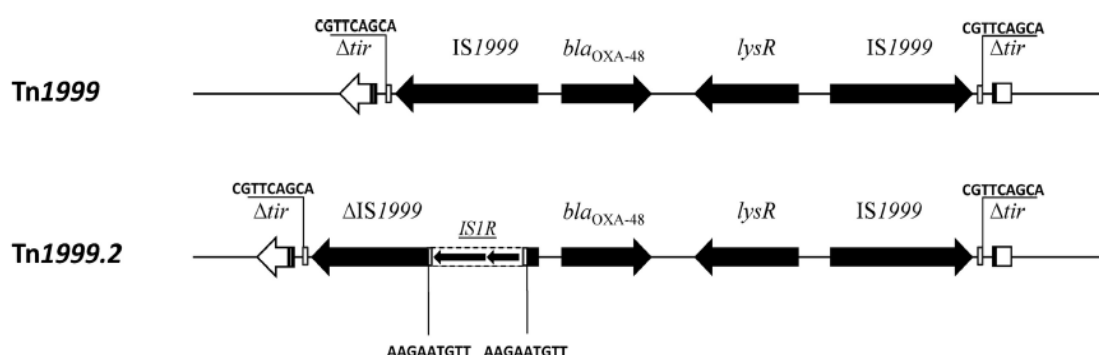


Figura 7. Representación esquemática de la estructura genética asociada al gen que codifica para la carbapenemasa OXA-48 (modificado de Giani y cols. (58)).

En un principio se propuso a la bacteria acuática *Shewanella oneidensis* como el origen de la carbapenemasa OXA-48 al encontrarse en su cromosoma una carbapenemasa de clase D (OXA-54) que comparte un 84% y un 92% de identidad a nivel nucleotídico y aminoacídico respectivamente (59). Sin embargo, un estudio más reciente ha encontrado

en la especie *Shewanella xiamenensis* un origen más probable del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> al localizarse un gen *bla* que codifica una carbapenemasa de clase D (OXA-199) que sólo difiere en 3 aminoácidos respecto a *bla*<sub>OXA-48</sub> (60). Muy probablemente la secuencia de inserción IS1999 ha catalizado la movilización de las carbapenemasas desde el cromosoma de especies de *Shewanella* en plásmidos que se han diseminado a otras especies de bacterias.

Los datos obtenidos de la estructura tridimensional y los estudios de dinámica molecular de la proteína OXA-48 le otorgan unas características de hidrólisis diferentes a las de otras carbapenemasas del grupo D, en las que la CMI a carbapenémicos se pueden encontrar elevadas pero todavía en el rango de sensibilidad de los puntos de corte propuestos por los comités científicos, tiene la capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas pero su capacidad de hidrólisis frente oximino-cefalosporinas es débil (52). Desde el descubrimiento de la carbapenemasa OXA-48 se han descrito múltiples variantes que difieren en un pequeño número de aminoácidos con respecto a la secuencia de OXA-48, entre las que se encuentran: OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244 y OXA-245.

Desde las zonas tradicionalmente endémicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48: Turquía, Oriente Medio y norte de África, en los últimos años se ha producido una rápida diseminación a los países europeos, muy probablemente relacionado con los intercambios poblacionales con países de las citadas áreas. Los países europeos que más rápidamente se han visto afectados han sido Francia, España, Holanda, Alemania, Bélgica, Suiza y Reino Unido, convirtiéndose en algunos de ellos en el tipo de carbapenemasa predominante (61-63). Por el momento en el



continente americano (64), Rusia, China y Australia sólo se han comunicado casos esporádicos de enterobacterias productoras de carbapenemasa "OXA-48 like" (65). De manera similar a lo descrito con las carbapenemasas del tipo NDM en lo referente a su detección en el medio ambiente, se han encontrado cepas de *S. marcescens* procedentes de aguas estancadas en Marrakech conteniendo el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> (66), no pudiéndose descartar la existencia de infecciones de origen comunitario en estas zonas endémicas (67).

## Objetivos



Los objetivos planteados en esta Tesis doctoral son:

- Analizar las características microbiológicas, epidemiológicas y clínicas de un brote por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el complejo hospitalario Hospital Universitario La Paz-Cantoblanco durante el periodo de diciembre de 2010 a junio de 2013.
- Describir la distribución espacial y temporal del brote: inicio y diseminación.
- Conocer la diversidad genética de los aislados de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48, su estructura poblacional y las distribuciones espaciales y temporales de los principales clones epidémicos.
- Analizar los perfiles de resistencias a antibióticos asociados al brote, su diversidad, evolución a lo largo del tiempo y las diferencias con los diversos clones de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48.



## **Material y Métodos**



## **1. Ámbito del estudio, características y recogida de datos**

El Hospital Universitario La Paz es un centro hospitalario terciario público con 1.328 camas que ofrece asistencia sanitaria al área norte de Madrid. El área cubierta engloba un censo cercano a los 600.000 habitantes que incluye población urbana y rural. El complejo hospitalario comprende cuatro hospitales de agudos: Hospital General, Hospital Maternal, Hospital Infantil y el Hospital de Traumatología y Rehabilitación; y un centro (Hospital de Cantoblanco) situado a 15 km con 149 camas que abarca las especialidades de cirugía ortopédica y traumatología, cirugía general, geriatría, neumología, rehabilitación y medicina interna. En el año 2014 se incorporó al complejo hospitalario el Hospital Carlos III con 114 camas que ofrece asistencia a pacientes de media estancia. La actividad asistencial anual que asume el centro es de aproximadamente 48.000 ingresos y 400.000 estancias, 1.242.000 consultas externas, 285.000 urgencias, 46.000 intervenciones quirúrgicas, 10.000 partos y 150 trasplantes de órgano sólido. El Hospital de Cantoblanco alcanza anualmente una media de 3.250 ingresos y 35.000 estancias. Al Hospital Universitario La Paz están adscritos 3 centros de atención especializada ambulatoria y una treintena de centros de atención primaria.

Para la recogida de datos se definieron como casos todos aquellos pacientes atendidos en el complejo hospitalario del Hospital Universitario La Paz, centros de atención especializada ambulatoria o atención primaria dependientes del mismo, en los que se aislaron especies de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en alguna muestra clínica o de colonización. En las muestras clínicas sólo se consideraron aquellos aislados obtenidos a partir de muestras significativas desde el punto de vista



microbiológico y/o clínico, para ello se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Orinas: se interpretaron según los criterios de Kass (68) considerándose significativo el aislamiento de  $\geq 10^5$  ufc/ml de un solo microorganismo y estearasa leucocitaria positiva. Se admitieron recuentos inferiores en orinas obtenidas por punción suprapúbica o directamente del riñón, mujeres jóvenes con síndrome miccional, hombres con leucocituria y orinas obtenidas por sondaje vesical. Sólo se consideraron los cultivos mixtos en población anciana hospitalizada o con sondaje vesical y clínica compatible.
- Muestras de esputo y aspirados traqueales: se aplicaron los criterios de Murray y Washington (69) y sólo se consideraron aptos para el cultivo aquellas muestras que en la tinción de Gram presentaban menos de 10 células epiteliales y más de 25 polimorfonucleares/campo 100x. Las muestras con más de 10 células epiteliales/campo y más de 25 polimorfonucleares/campo 100x se consideraron aptas cuando estaba presente un morfotipo bacteriano predominante.
- Aspirados bronquiales: se consideraron significativos recuentos  $\geq 10^4$  ufc/ml.
- Catéteres intravasculares y piel pericatéter: se procesaron mediante cultivo semicuantitativo, la punta de catéter utilizando la técnica de Maki (70); y sólo los microorganismos presentes en un recuento mayor o igual a 15 ufc fueron considerados significativos.
- Muestras de heridas o piel: no se consideraron aquellas muestras sin signos de infección (ausencia de leucocitos en la tinción de Gram).

Con independencia de la significación microbiológica se consideraron significativas aquellas muestras con cuadro infeccioso compatible en función de los datos clínicos proporcionados.

Cuando se diagnosticaba un nuevo caso se recogieron de manera prospectiva los datos demográficos (edad, sexo, Grupo Funcional Homogéneo o GFH de procedencia de la muestra, y fecha de obtención) y microbiológicos (tipo de muestra, especie, antibiograma) relativos a la primera muestra clínica o de colonización, el seguimiento de los aislamientos posteriores que se obtenían en cada uno de los nuevos casos se realizó semanalmente y de manera retrospectiva mediante consulta en el sistema de información del laboratorio (SIL). Cuando se consideró necesaria la recogida de datos clínicos, periodos y lugares de ingreso, éstos se obtuvieron a través de las aplicaciones Estación Clínica y HP-His (Hewlett-Packard). El periodo de estudio comprendió desde la aparición del primer caso y comienzo del brote en diciembre de 2010 hasta junio de 2013. Con el objetivo de encontrar aislados anteriores al inicio del brote, se buscaron de manera retrospectiva enterobacterias con un fenotipo de resistencia compatible con la producción de OXA-48 que fueron obtenidas del cepario del Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica para ampliar su estudio.

## **2. Muestras clínicas**

Las muestras se recibieron y procesaron en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica tras comprobar que cumplían los requisitos mínimos para su procesamiento. Las muestras se sembraron en los medios necesarios y en las condiciones ambientales adecuadas en función de los protocolos establecidos en las distintas unidades del servicio y cuyos Protocolos Normalizados de Trabajo forman parte de la

documentación del Sistema de Calidad del Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica.

### **3. Muestras de colonización**

Durante el periodo de estudio, en el Hospital Universitario La Paz se recogían semanalmente de manera rutinaria muestras de colonización rectal, faríngea, piel axilar y piel inguinal en: Unidad de Cuidados Intensivos Médicos, Reanimación y Quemados; muestras rectales y faríngeas en la Unidad de Neonatología; y muestras rectales en la Unidad de Hematología de adultos. Históricamente y durante el inicio del brote la recogida y procesamiento de las muestra de colonización eran llevadas a cabo por el Servicio de Medicina Preventiva, a partir de agosto de 2011 este trabajo es asumido en su totalidad por el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Puntualmente se realizaron cribados en muestras rectales de aquellas plantas en las que se producía un caso nuevo de enterobacteria productora de carbapenemasa OXA-48 detectado en muestras clínicas. La muestras de colonización se sembraron en agar MacConkey (MacConkey no. 3, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado con 4 mg/L de cefotaxima (71).

### **4. Identificación bacteriana y antibiograma**

La identificación bacteriana y el antibiograma se realizaron de manera prospectiva. Para la identificación se utilizó la técnica de espectroscopía de masas mediante el sistema MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Para ello se aplicaron directamente las colonias en la tarjeta metálica

(Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) dejándolas secar a temperatura ambiente para posteriormente añadir 1 µl de matriz de ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico. Una vez seca la matriz se procedió a la lectura en el espectrómetro, éste tiene asociado un programa informático (Flex Control) para la obtención y lectura del espectro y un programa específico de identificación (MALDI-Biotyper 2.0) que contiene la base de datos suministrada por el fabricante. La comparación de los patrones espectrales del aislado a identificar con la base de datos obtiene una puntuación logarítmica cuyo valor permite definir especie ( $\geq 2$ ), género ( $< 2$  y  $\geq 1,7$ ) o ausencia de identificación ( $< 1,7$ ), respectivamente.

Los estudios de sensibilidad se realizaron mediante los sistemas automáticos Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) para el procesamiento de los aislados procedentes de hemocultivos y Wider (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España) para el resto de aislados procedentes de muestras clínicas. El equipo Vitek 2 es un sistema que utiliza la técnica de microdilución y monitoriza la cinética de crecimiento bacteriano cada 15 minutos mediante análisis turbidimétrico. Permite la obtención de resultados entre 4-10 horas en bacterias de crecimiento rápido. Para la determinación de la sensibilidad con el sistema Vitek 2 se utilizaron las tarjetas AST-N243 que se inocularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante con una concentración final de  $8 \times 10^6$  ufc/ml preparada a partir de una suspensión 0,5 McFarland. En pacientes con antecedentes de infección o colonización por enterobacterias multirresistentes, el estudio de resistencia a antibióticos de enterobacterias aisladas en muestras de hemocultivos se completaba con la tarjeta AST-N248. El sistema Wider es un analizador automático de imágenes que utiliza la técnica de microdilución en placa. Se utilizaron los paneles para

gramnegativos UROCULT para aislados procedentes de urocultivos y REV.2 para aislados procedentes del resto de muestras. A partir de mayo de 2012 se cambian estos paneles por los paneles UROCULT y MIC/ID gramnegativos de MicroScan (Sacramento, CA, EEUU) adaptados a Wider. Los paneles se inocularon según las instrucciones del fabricante para obtener una concentración final aproximada de  $5 \times 10^5$  ufc/ml, posteriormente se incubaron entre 16-20 horas a 35°C en un incubador sin CO<sub>2</sub> para finalmente proceder a la lectura. Los resultados obtenidos de los sistemas automáticos se interpretaron en función de la CMI con independencia de la interpretación de los sistemas expertos. Los aislados fueron categorizados como sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia de acuerdo con los criterios del CLSI (72, 73), a excepción de la tigeciclina que se evaluó según los criterios de la FDA (74). Cuando las CMI a ertapenem, imipenem y meropenem eran dudosas o estaban en un rango de sensibilidad intermedio se confirmaron mediante la técnica de difusión en gradiente utilizando el épsilon test (Etest, bioMérieux), al igual que las resistencias a tigeciclina, colistina y amikacina.

Para minimizar la prescripción de tratamientos antibióticos en pacientes que sólo estaban colonizados, no se les realizaron estudios de sensibilidad antibiótica de manera rutinaria por sistemas automáticos a los aislados procedentes de muestras de colonización. En estas muestras únicamente se identificaron e informaron la especie bacteriana aislada y su mecanismo de resistencia, siempre que ambos (especie y mecanismo de resistencia) estuvieran incluidos en los criterios de aplicación al paciente de precauciones de contacto y previo acuerdo con el Servicio de Medicina Preventiva. La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados

obtenidos de muestras de colonización se describe en los apartados 5, 6, 7 y 9.

## **5. Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido y AmpC**

Cuando en los aislados clínicos los sistemas automáticos Wider y Vitek 2 no confirmaban la presencia de BLEE y la lectura interpretada del antibiograma sugería su presencia, se realizó la confirmación fenotípica mediante el método de difusión en placa con tiras de Etest (Etest ESBL) que contenían cefotaxima (0,25-16 mg/L) /cefotaxima (0,016-1 mg/L)-ácido clavulánico (4 mg/L) y ceftazidima (0,5-32 mg/L) /ceftazidima 0,064-4 mg/L)-ácido clavulánico (4 mg/L) (bioMérieux). En el caso de enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo AmpC y CMI a cefepime >1 mg/L la confirmación se realizó con Etest conteniendo cefepime (0,25-16 mg/L)/cefepime (0,064-4 mg/L)-ácido clavulánico (4 mg/L) (bioMérieux). Se informaron como BLEE aquellos aislados en los que la diferencia entre la cefalosporina sola y con el ácido clavulánico era al menos de tres diluciones.

A todos los aislados procedentes de muestras de colonización se les realizó antibiograma en placa de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) con discos (BD-Sensi Disc, BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Alemania) conteniendo 30 µg de cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, cefepime y aztreonam; y discos combinados con inhibidor de cefotaxima-ácido clavulánico (30/10 µg) y ceftazidima-ácido clavulánico (30/10 µg). Un incremento del halo  $\geq 5$  mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin clavulánico se consideró como un resultado positivo para la producción de BLEE. La colocación de los discos de cefotaxima y aztreonam (inductores débiles) próximos al disco de cefoxitina (inductor fuerte) sirvió para

evidenciar el carácter inducible de las betalactamasas AmpC de origen plasmídico en cepas de *K. pneumoniae*, por el achatamiento del halo del betalactámico inductor débil en la zona adyacente al del inductor fuerte. Los aislados de *Klebsiella* spp., *P. mirabilis*, *C. koseri* y *C. amalonaticus* con un fenotipo compatible con la presencia de AmpC: resistencia a cefotaxima y ceftazidima que no es inhibida por el ácido clavulánico y colonias dispersas en los halos de inhibición de cefalosporinas y aztreonam, se confirmaron mediante una prueba de sinergia de doble disco que consistía en la ampliación del halo de inhibición de cefotaxima y ceftazidima en la zona próxima a un disco de cloxacilina de 500 µg preparado a partir discos blancos y una solución de cloxacilina inyectable. El disco de cefepime permitió la diferenciación de otros mecanismos de resistencia (producción de BLEE o carbapenemasas) en enterobacterias hiperproductoras de AmpC cromosómica.

## **6. Detección fenotípica de carbapenemasas**

Se confirmó la producción de carbapenemasas a todos los aislados clínicos con CMI >1 mg/L a imipenem o meropenem o CMI >0,5 mg/L a ertapenem y de forma sistemática a todos los aislados procedentes de muestras de colonización. Para ello se realizó test de Hodge modificado (THM) utilizando discos de ertapenem, meropenem e imipenem (72, 73). En los aislados clínicos se descartó la producción de carbapenemasas de clase A y B mediante la prueba de doble difusión con discos de meropenem, ácido borónico y EDTA, respectivamente.

## **7. Extracción de ADN**

### **7.1. Hervido/lisis bacteriana**

Se suspendió 1 asa de cada cepa en 200 µl de tampón TE que se agitó en vortex hasta conseguir una suspensión completa. Posteriormente se sometió a calentamiento durante 10 minutos a 100°C en termobloque para finalmente centrifugar el lisado durante 5 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante obtenido se utilizó para la detección molecular de carbapenemasas.

### **7.2. Purificación del ADN bacteriano**

La extracción del ADN bacteriano utilizado en los métodos de tipificación molecular se efectuó mediante un método comercial basado en columnas de sílice (Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit®, MOBIO, Solana Beach, California). A partir de las colonias aisladas en cultivo puro en placa de agar sangre se obtuvo un volumen de elución final de 50 µl de ADN purificado.

## **8. Caracterización genotípica de betalactamasas**

Los oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de amplificación fueron se muestran en la tabla 10:



Tabla 10. Cebadores utilizados en la detección de genes de BLEE.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana	Tamaño producto de amplificación (pb)	Referencia
<b>CTXM-F</b>	SCSATGTGCAGYACCAG TAA	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	432	(75)
<b>CTXM-R</b>	ACCAGAAVAGCGGBG C			
<b>OXA-F</b>	CAGATTCAACTTTCAAG ATCG	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	612	(76)
<b>OXA-R</b>	GTGTTTAGAATGGTGA TCG			
<b>SHV-F</b>	CACTATCGCCAGCAGG ATCT	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	357	Diseño propio
<b>SHV-R</b>	GATCGTCCACCATCCAC TG			
<b>TEM-F</b>	CGCCGCATACACTATTC TCA	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	338	Diseño propio
<b>TEM-R</b>	TTGCCGGAAGCTAGA GTAA			

Las reacciones se prepararon en tubos separados (uno para cada betalactamasa) con un volumen final de 50 µl de acuerdo con las siguientes cantidades tabla 11:

Tabla 11. Mezcla de reacción para la detección de BLEE mediante PCR a tiempo final.

Reactivos	µl/tubo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	36	
Bitools® 10x PCR buffer	5	2 mM Mg <sup>2+</sup>
Bitools® dNTPs [10mM]	1	0,2 mM
Oligonucleótido-F (10 µM)	1	0,2 µM
Oligonucleótido-R (10 µM)	1	0,2 µM
Bitools® DNA Polymerase (1U/µl)	1	0,02 U/µl

A cada tubo de amplificación se añadieron 5 µl de lisado. Las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores MyGene™ MG96+ (LongGene Scientific Instruments, Hangzhou, China) y las temperaturas y tiempos utilizados en las distintas fases de amplificación fueron:

Desnaturalización inicial	Amplificación	Elongación final
95°C 5'	95°C 30''	72°C 5'
	50°C 30''	
	72°C 1'	
	<b>35 ciclos</b>	

Para la visualización de los productos de amplificación se prepararon geles de agarosa (Agarose D1 low EEO-GQT, Pronadisa, Madrid, España) al 1% en tampón TAE 1x (70) y mediante electroforesis en corriente continua. Los pocillos de los geles se cargaron con 5 µl ADN amplificado mezclado con un volumen de tampón de carga 6x de 1 µl. La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal, con tampón TAE 1x a 125 V durante 30 min, el tamaño de las bandas obtenido se comparó con los controles y un marcador

de peso molecular de 100 bp (100-1.000 pb) (Biotools®). La visualización de los fragmentos de ADN se realizó por tinción de los geles con bromuro de etidio y visualización en un transiluminador de luz ultravioleta. Los productos de amplificación se secuenciaron según se detalla en el apartado 12.

## **9. Detección genotípica de carbapenemasas**

El primer aislado de cada paciente en el que se detectaba fenotípicamente la producción de carbapenemasa, se confirmaba mediante métodos genotípicos. Lo mismo para cualquier otro aislado en muestras posteriores cuyo fenotipo no pudiera deducirse inequívocamente mediante una lectura interpretada del antibiograma o las pruebas fenotípicas correspondientes. Los aislados procedentes de muestras de hemocultivos y líquidos estériles y fenotipo compatible siempre se confirmaban mediante técnicas moleculares con independencia de que se tratase o no de una primera muestra.

### **9.1. PCR convencional a tiempo final**

En el comienzo y durante el primer año del brote la amplificación y detección de los genes de carbapenemasas se realizó mediante la técnica de PCR en formato múltiple con posterior visualización del producto amplificado en gel de agarosa. Los oligonucleótidos cebadores utilizados en la reacción fueron tabla 12:

Tabla 12. Cebadores utilizados en la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo final.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana	Tamaño producto de amplificación (pb)	Referencia
<b>KPC-F</b>	ATGTCACTGTATCGCC GTCT	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	892	(77)
<b>KPC-R</b>	TTTTCAGAGCCTTACT GCCC			
<b>OXA-48A</b>	TTGGTGGCATCGATTA TCGG	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	743	(52)
<b>OXA-48B</b>	GAGCACTTCTTTGTG ATGGC			
<b>VIMF</b>	ATGGTGTGTTGGTCGCA TATC	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	592	(78)
<b>RVIM</b>	CAAGTCTAGACCGCCC GG			Diseño propio
<b>IMPF</b>	AATAGAGTGGCTTAAT TCTC	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	284	Diseño propio
<b>IMPR</b>	GCGGACTTTGGCCAA GCTTC			Diseño propio

Las reacciones se prepararon con un volumen final de 50 µl de acuerdo con las siguientes cantidades tabla 13:

Tabla 13. Mezcla de reacción para la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo final en formato múltiple.

Reactivos	µl/tubo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	30	
Biotools® 10x PCR buffer	5	2 mM Mg <sup>2+</sup>
Biotools® dNTPs [10mM]	1	0,2 mM
KPC-F (10 µM)	1	0,2 µM
KPC-R (10 µM)	1	0,2 µM
OXA-48A (10 µM)	1	0,2 µM
OXA-48B (10 µM)	1	0,2 µM
VIMF (10 µM)	1	0,2 µM
RVIM (10 µM)	1	0,2 µM
IMPF (10 µM)	1	0,2 µM
IMPR (10 µM)	1	0,2 µM
Biotools® DNA Polymerase (1U/µl)	1	0,02 U/µl

En cada tubo de reacción se añadieron 5 µl de lisado. Las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores MyGene™ MG96+ (LongGene Scientific Instruments) con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	Amplificación	Elongación final
95°C 5'	95°C 20''	72°C 5'
	50°C 20''	
	72°C 1'	
	<b>35 ciclos</b>	

La visualización de los productos de amplificación se realizó con geles de agarosa como figura en el apartado 7.

## 9.2. PCR a tiempo real

Después del primer año del comienzo del brote y ante el aumento del número de casos se implementó una PCR a tiempo real cuyo objetivo fue fundamentalmente el de disminuir el tiempo de respuesta a la hora de categorizar a los pacientes con o sin aislados bacterianos productores de

carbapenemasa OXA-48. Para alcanzar este propósito se puso a punto una PCR a tiempo real en formato múltiple con sondas tipo TaqMan® para la detección de las carbapenemasas más prevalentes en ese momento en el Hospital Universitario La Paz: OXA-48 y VIM. Los oligonucleótidos cebadores y sondas utilizados fueron tabla 14:

Tabla 14. Cebadores y sondas utilizados en la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo real.

Oligonucleótido /Sonda	Secuencia 5'-3'	Diana	Tamaño producto de amplificación (pb)	Referencia
<b>OXA-48qF</b>	TTCGGCCACGGAGCA AATCAG	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	239	(79)
<b>OXA-48qR</b>	GATGTGGGCATATCC ATATTCATCGCA			
<b>OXA-48P</b>	6FAM- CTGGCTGCGCTCCGAT ACGTGTAACCTATTG- BHQ1			
<b>VIMqF</b>	GCATCACCGTCGACAC GCC	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	236	Diseño propio
<b>VIMqR</b>	ATCGGCCACGTTCCCC GC			
<b>VIMP</b>	Cy5- TTCTATCCTGGTGCTG CGCATTC-BHQ2			

Las reacciones se prepararon con un volumen final de 20 µl de acuerdo con las siguientes cantidades tabla 15:

Tabla 15. Mezcla de reacción empleada para la detección de genes de carbapenemasas mediante PCR a tiempo real.

Reactivos	µl/tubo	Concentración final
OXA-48qF (10 µM)	1	0,5 µM
OXA-4qR (10 µM)	1	0,5 µM
VIMqF (10 µM)	1	0,5 µM
VIMqR (10 µM)	1	0,5 µM
OXA-48P (10 µM)	0,4	0,2 µM
VIMP (10 µM)	0,4	0,2 µM
Premix Ex Taq™ Mix 2x		
Perfect Real Time (Takara Bio Inc., Shiga, Japón)	10	
ROX Reference Dye (Takara Bio Inc.)	0,4	

En cada tubo de reacción se añadieron 4,8 µl de lisado bacteriano. Las reacciones se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) que se programó a las temperaturas y tiempos:

Desnaturalización inicial	Amplificación
95°C 5'	95°C 15''
	60°C 1' *
	40 ciclos

\*Adquisición de fluorescencia.

## 10. Caracterización genotípica de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos

Para la caracterización se seleccionaron cepas de *K. pneumoniae* con un fenotipo de sensibilidad disminuida a ciprofloxacino y sensibles a ácido nalidíxico. El estudio se realizó sobre las dos cepas que constituían los clones mayoritarios en ese momento y se analizaron los genes: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC*, *qepA*, *oqxAB* y *aac(6')-Ib-cr*, además de realizar la caracterización del entorno genético. La parte experimental y el análisis de

los resultados se realizaron en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla por Rodríguez Martínez y cols. (80).

## 11. Tipado molecular

### 11.1. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

La amplificación del ADN se realizó utilizando 3 cebadores distintos, uno por cada tubo de reacción tabla 16:

Tabla 16. Cebadores empleados en la reacción de PCR para la caracterización genotípica mediante RAPD

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
<b>OPA2</b>	TGCCGAGCTG
<b>OPA18</b>	AGGTGACCGT
<b>OPI12</b>	AGAGGGCACA

Por tanto, para cada aislado se prepararon tres tubos de reacción según las cantidades que figuran a continuación tabla 17:

Tabla 17. Mezcla de reacción utilizada en la reacción de amplificación para la caracterización genotípica mediante RAPD.

Reactivos	µl/tubo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	9	5 µM
Cebador (100 µM)	1	
MBL Red Taq Polimerasa® Mix 2,5x (MolBioLab, Córdoba, España)	8	1x



En cada tubo de reacción se añadieron 2 µl de ADN bacteriano purificado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyGene™ MG96+ (LongGene Scientific Instruments), siendo las temperaturas y tiempos:

Desnaturalización inicial	Amplificación	Elongación final
95°C 5'	95°C 30''	72°C 10'
	36°C 30''	
	72°C 2'	
	35 ciclos	

## 11.2. rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindrom-PCR*) automatizada

Para el análisis molecular mediante rep-PCR se utilizó el sistema automatizado Diversilab™ (bioMérieux). El ADN purificado se amplificó utilizando los reactivos que proporciona el *DiversiLab DNA Fingerprinting kit* para *Klebsiella* spp. junto con el enzima AmpliTaq DNA Polimerasa y el buffer GeneAmp 10X PCR buffer (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) en las siguientes proporciones tabla 18:

Tabla 18. Mezcla de reacción utilizada en la reacción de amplificación para la caracterización genotípica mediante rep-PCR automatizada (Diversilab™).

Reactivos	µl/tubo	Concentración final
rep-PCR MM1	18	
Primer mix	2	
GeneAmp 10X PCR buffer	2,5	1x
AmpliTaQ DNA Polimerasa	0,5	0,1 U/µl

Se añadieron 2 µl del ADN purificado a cada tubo de reacción y la amplificación se realizó en un termociclador MyGene™ MG96+ con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	Amplificación	Elongación final
95°C 2'	95°C 30''	70°C 3'
	55°C 30''	
	70°C 1'30''	
	<b>35 ciclos</b>	

El ADN amplificado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa en una matriz de microfluidos (DiversiLab™ LabChip, bioMérieux), utilizando un analizador Agilent 2100 para la electroforesis (Agilent Technologies). A cada muestra problema se le añadieron marcadores de peso molecular para valorar tanto la cantidad como la calidad del ADN y la normalizar la migración en el gel de electroforesis. Para el análisis se utilizó el software de Diversilab versión 3.4.40, las matrices de distancia se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Pearson y los dendrogramas se construyeron en base al algoritmo de la media aritmética no ponderada o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*). Los informes se fueron generados automáticamente, incluían los electroferogramas, dendrograma con geles virtuales, gráfico de dispersión, matriz de distancias y los campos demográficos: n° de muestra, cepa, lugar de aislamiento (servicio o unidad del hospital) y fecha de la muestra.

### 11.3. MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

Para el análisis de las relaciones clonales mediante MLST se seleccionaron aislados representativos de cepas de *K. pneumoniae* que se agrupaban según un mismo patrón obtenido previamente con Diversilab. Para ello se amplificaron los genes *housekeeping*: *rpoB* (subunidad beta de la ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucoasa isomerasa), *phoE* (fosforina E),

*infB* (factor iniciador de la traducción 2), *tonB* (transductor de energía periplásmico) de acuerdo con el esquema propuesto por el Instituto Pasteur:

<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>.

Los oligonucleótidos cebadores y las condiciones de las reacciones de amplificación (Tabla 19) se realizaron según el protocolo de Diancourt y cols. (81):

Tabla 19. Cebadores y condiciones de las reacciones de amplificación utilizadas para la caracterización genotípica mediante MLST.

Diana	Secuencia oligonucleótidos 5'-3'	Tamaño producto de amplificación (pb)	Condiciones reacción de amplificación		
			Desnatura lización	Amplificación	Elongación
<i>gapA</i>	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	450	95°C 5'	95°C 30'' 60°C 30'' 72°C 1'	72°C 5'
<i>rpoB</i>	GGCGAAATGGCWGAGAACCA RGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	510		35 ciclos	
<i>Mdh</i>	CCCAACTCGCTTCAGGTTGAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	477			
<i>Pgi</i>	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	432	95°C 5'	95°C 30'' 50°C 30'' 72°C 1'	72°C 5'
<i>phoE</i>	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	420		35 ciclos	
<i>infB</i>	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	318			
<i>tonB</i>	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	414	95°C 5'	95°C 30''	72°C 5'
				45°C 30''	
				72°C 1'	
				35 ciclos	

Los productos de amplificación se secuenciaron según la descripción del apartado 12. Las secuencias se identificaron comparando con la base de datos de MLST de *K. pneumoniae*: <http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/>.

## 12. Secuenciación

Los productos se purificaron con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, Ohio, EEUU) y fueron secuenciados mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism siguiendo el método de Sanger (82) y utilizando la química del BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

La secuenciación del genoma completo de *K. pneumoniae* KpO3210 (ST405) se realizó en un secuenciador Illumina GAllx (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) previa fragmentación del ADN en fragmentos de aproximadamente 400 pb. La lectura se realizó en modo *paired-ends* (2x100), generándose 14 millones de lecturas. El ensamblaje *de novo* y orientación de las lecturas obtenidas se construyeron con los programas Velvet y Nucmer respectivamente, usando como referencia el genoma de *K. pneumoniae* MGH 78578 (83), el ensamblaje generado contiene 214 *contigs* organizados en 64 *scaffolds* y conteniendo 6,4 Mb (Genbank nº [AMRH00000000](#)). Posteriormente se generaron una librería *single-end* y dos librerías *paired-ends* de 3 y 8 Kb respectivamente. La primera se secuenció en una carrera, y las dos *paired-ends* se secuenciaron juntas utilizando un sistema GS Junior 454 (Roche Diagnostics Corporation, Basilea, Suiza) en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM). La carrera en *single-end* generó 197.330 lecturas y la carrera en *paired-ends* generó 219.259 lecturas. Todas ellas se ensamblaron *de novo* en modo progresivo utilizando Newbler 3.0 (Roche) generando un ensamblaje de 5

*scaffolds* y 5,79 Mb. El genoma de *K. pneumoniae* KpO5834 (ST11) se realizó en *single-end* en un sistema GS Junior 454, generando 195.891 lecturas que se ensamblaron *de novo* con Newbler 3.0 (Roche) generando un ensamblaje de 81 contigs y 5,48 Mb. En el análisis del clon ST11 se utilizó también el genoma secuenciado en el Hospital 12 de Octubre por Villa y cols. (84).

La anotación de los ensamblajes se llevó a cabo con RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), y la detección de genes de resistencia con ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Las mutaciones cromosómicas de resistencia a antibióticos se analizaron comparando los genes candidatos con la base de datos mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **13. Análisis estadístico**

Para el cálculo del IC95% se aplicó el método aproximado de Agresti-Coull para tamaños muestrales mayores a 30 y el método exacto de Clopper-Pearson para tamaños iguales o menores a 30. La determinación de la significación estadística para variables cualitativas se calculó con la aproximación exacta de Fisher. Se consideraron como valores estadísticamente significativos aquellos con  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, EEUU) versión 15.0 para Windows.



## Resultados





## 1. Antecedentes e inicio del brote

El día 16 de diciembre del año 2010 se identificó un aislado de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos carbapenémicos en una muestra de esputo procedente de un paciente ingresado en Reanimación de Cirugía Cardiotorácica del Hospital Universitario La Paz. Durante ese mismo mes fueron identificados otros tres pacientes ingresados en tres áreas distintas del hospital: Oncología/Cuidados Paliativos, Medicina Interna y Reanimación del Hospital Maternal en una paciente previamente ingresada en Cirugía General, las muestras fueron hemocultivo, orina y líquido ascítico respectivamente. El antibiograma interpretado de estas cepas se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Antibiograma interpretado de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48 aisladas en muestras clínicas de pacientes ingresados en el Hospital General del Hospital Universitario La Paz durante el mes de diciembre de 2010.

Amoxicilina	R	Cotrimoxazol	R
Piperacilina	R	Ácido nalidixico	S
Amoxicilina/Clavulánico	R	Ciprofloxacino	S/I
Piperacilina/Tazobactam	R	Gentamicina	R
Cefalotina	R	Tobramicina	R
Cefuroxima	R	Amikacina	S
Cefoxitina	S	Tigeciclina	S
Cefotaxima	R	Colistina	S
Ceftazidima	R	Fosfomicina	S
Cefepime	R	Nitrofurantoína	I
Aztreonam	R		
Ertapenem	R		
Imipenem	R		
Meropenem	I/R		

S: Sensible, I: Sensibilidad intermedia y R: Resistente.

Las características fenotípicas de resistencia a betalactámicos consistían en resistencia a carbapenémicos, fundamentalmente ertapenem e imipenem, pero se mantenía la sensibilidad a cefoxitina sugiriendo la presencia de una BLEE. En estas cepas las CMIs para amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam siempre estaban en el rango de resistencia, pero permitieron poner de manifiesto la presencia de BLEE viendo el efecto sinérgico del ácido clavulánico mediante Etest-ESBL o con discos combinados con inhibidor. La sensibilidad al ácido nalidíxico y la sensibilidad disminuida o resistencia clara a ciprofloxacino sugerían la presencia de un mecanismo de resistencia a quinolonas de origen plasmídico. La prueba de doble difusión con discos de meropenem, ácido borónico y EDTA fue negativa, al igual que la detección por PCR de las carbapenemasas de tipo VIM y KPC que eran las carbapenemasas detectadas hasta ese momento en el hospital. Durante la primera quincena del mes de enero de 2010 aparecieron tres casos nuevos de pacientes con *K. pneumoniae* que presentaban un fenotipo de resistencia similar a los casos del mes de diciembre, en el momento del aislamiento los pacientes estaban ingresados en tres plantas diferentes del Hospital de Traumatología y los aislados se obtuvieron de una muestra de tejido óseo, un hemocultivo y una infección asociada a catéter en la Unidad de Quemados. Se realizó estudio de clonalidad mediante RAPD comprobándose que los siete aislados de *K. pneumoniae* de los casos ocurridos en el mes de diciembre y primera quincena de enero eran cepas muy estrechamente relacionadas (Figura 8). Durante este periodo se puso a punto una PCR en formato múltiple a tiempo final (apartado 9.1) para la detección de carbapenemasas tipo KPC, VIM, IMP y OXA-48, pudiéndose

comprobar que las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos eran portadoras del gen *bla*<sub>OXA-48</sub>.

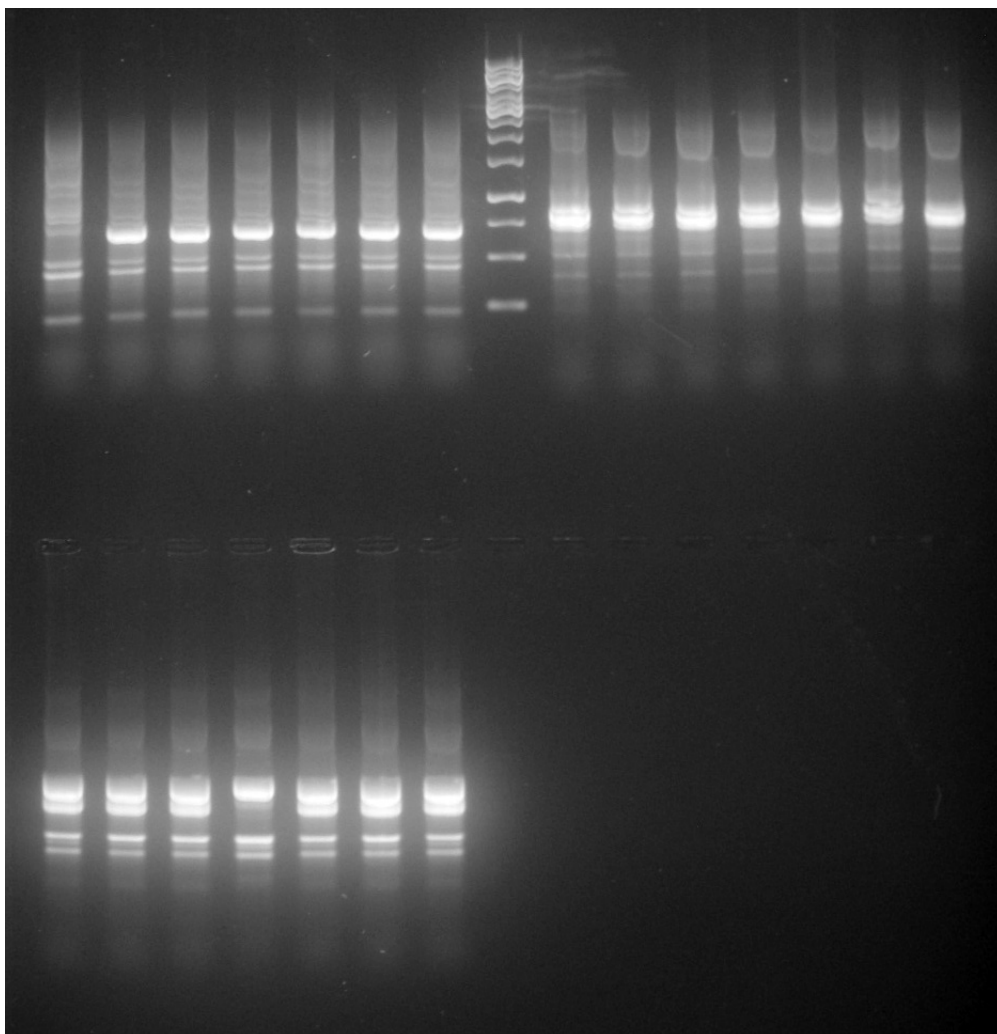


Figura 8. RAPD de las primeras siete cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48 aisladas en el Hospital General y Hospital de Traumatología del Hospital Universitario La Paz. La figura muestra una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos de los siete aislados con tres oligonucleótidos diferentes.

En la figura 9 se puede ver la incidencia de casos de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos durante el periodo anterior y en los dos primeros meses del brote. Se observa como el aumento de casos se produjo

a expensas de adultos hospitalizados, mientras que en los meses anteriores al inicio del brote (Enero a noviembre de 2010) la mayoría de los casos se originaban en el Hospital Infantil y en todos ellos se detectaron carbapenemasas tipo VIM.

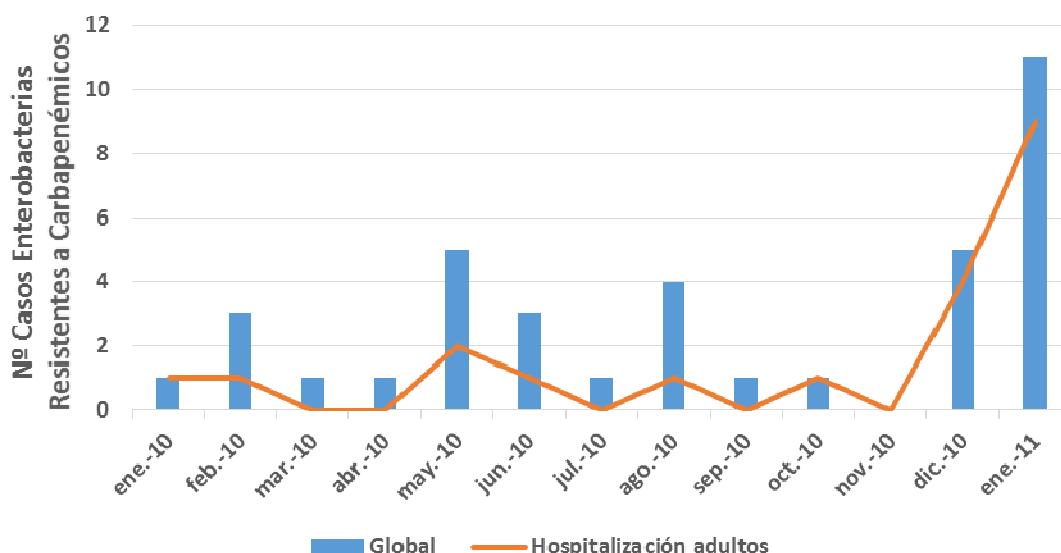


Figura 9. Incidencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos en el Hospital Universitario La Paz antes y en el inicio del brote (Diciembre de 2010 y enero de 2011).

Con la sospecha de que hubieran podido pasar desapercibidas cepas de *K. pneumoniae* en las que no se hubiese detectado la presencia de este mecanismo de resistencia, se buscaron de manera retrospectiva en el SIL del Servicio de Microbiología y Parasitología cepas de *K. pneumoniae* aisladas desde el año 2009 hasta la fecha de inicio del brote y con un fenotipo similar de resistencia. Se buscaron cepas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam pero obviando el perfil de sensibilidad a carbapenémicos. Se encontraron 10 cepas con este fenotipo de las cuales se pudieron recuperar 8 cepas (2 cepas no fueron viables). En 3 cepas se detectó la presencia del gen *bla<sub>OXA-48</sub>*, el resto eran cepas de *K. pneumoniae* productoras de AmpC plasmídica DHA-1 que

habían estado implicadas en un brote ocurrido en la Unidad de Quemados (85). Los 3 casos se habían aislado durante los meses de abril, junio y julio de 2010 en muestras de orina, esputo y hemocultivo respectivamente. La procedencia de las muestras en el momento del aislamiento fueron Urgencias del Hospital General, Unidad de Geriátrica del Hospital de Cantoblanco y Unidad de Reanimación de Cirugía General. En los 3 casos los antibióticos carbapenémicos que se habían ensayado en función del tipo de muestra se encontraban en el rango de sensibilidad, a excepción de un aislado que presentó una sensibilidad intermedia a meropenem.

## **2. Diseminación y extensión del brote en el periodo de diciembre 2010 a junio 2013**

Desde el comienzo en diciembre de 2010 el brote tuvo una amplia diseminación en distintas unidades del hospital sin aparente relación entre sí. Hasta la finalización del estudio se registraron un total de 473 pacientes infectados o colonizados por alguna especie de enterobacteria portadora del gen *bla<sub>OXA-48</sub>*, con una media de 15 casos (rango: 1-36) mensuales (Figura 10). Durante los últimos meses recogidos en el estudio (febrero-junio 2013) se observó un aumento importante en la incidencia de casos, esta incidencia se mantenía cuando se consideraban sólo los pacientes hospitalizados y se ajustaban las tasas por ingresos o por estancias (Figura 11).

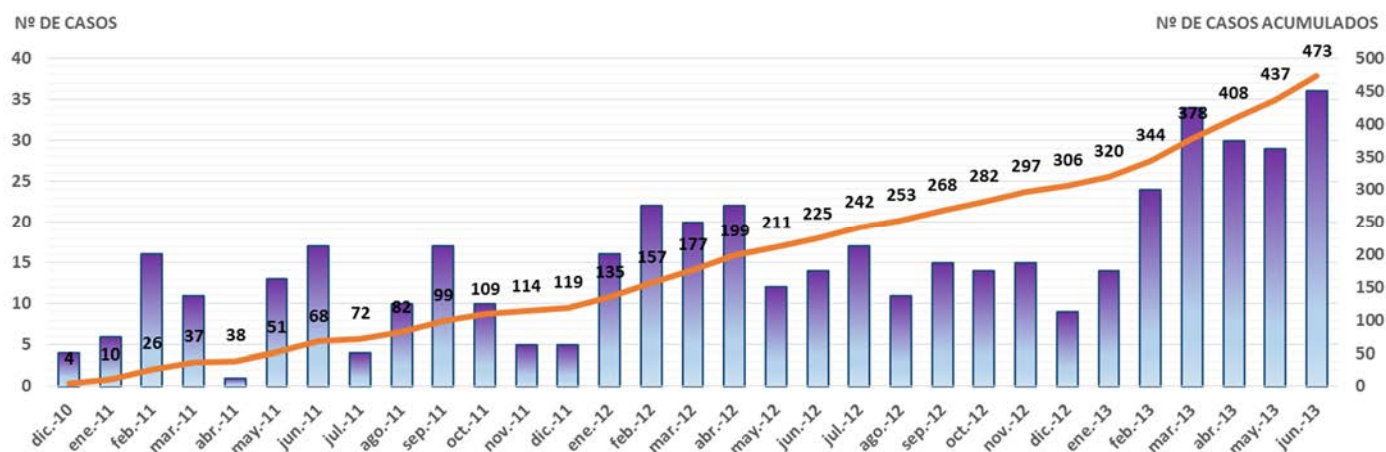


Figura 10. Casos incidentes mensuales en el eje de ordenadas izquierdo (barras) y casos acumulados a lo largo del tiempo en el eje de ordenadas derecho (línea).

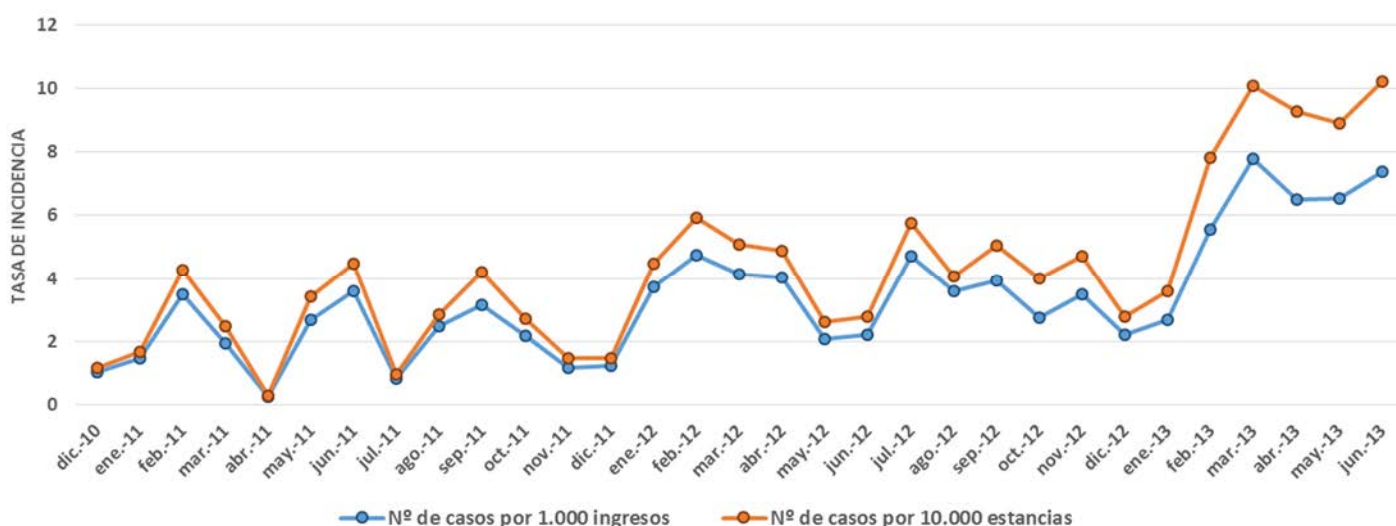


Figura 11. Tasas de incidencia mensuales en pacientes hospitalizados ajustadas por 1.000 ingresos y 10.000 estancias (pacientes-día).

Durante el brote se vieron afectados los 5 centros del complejo hospitalario (Figura 12): Hospital General, Hospital de Traumatología, Hospital Maternal, Hospital Infantil y Hospital de Cantoblanco. Destaca por encima de todos el Hospital General, con un 66,4% de los casos, mientras que el Hospital Infantil y Hospital Maternal se han visto afectados en menor medida con brotes puntuales muy localizados que pudieron ser

erradicados. Hay que resaltar por las implicaciones epidemiológicas, clínicas y terapéuticas el número de pacientes que procedían del Servicio de Urgencias del Hospital General (8,5% de los casos).

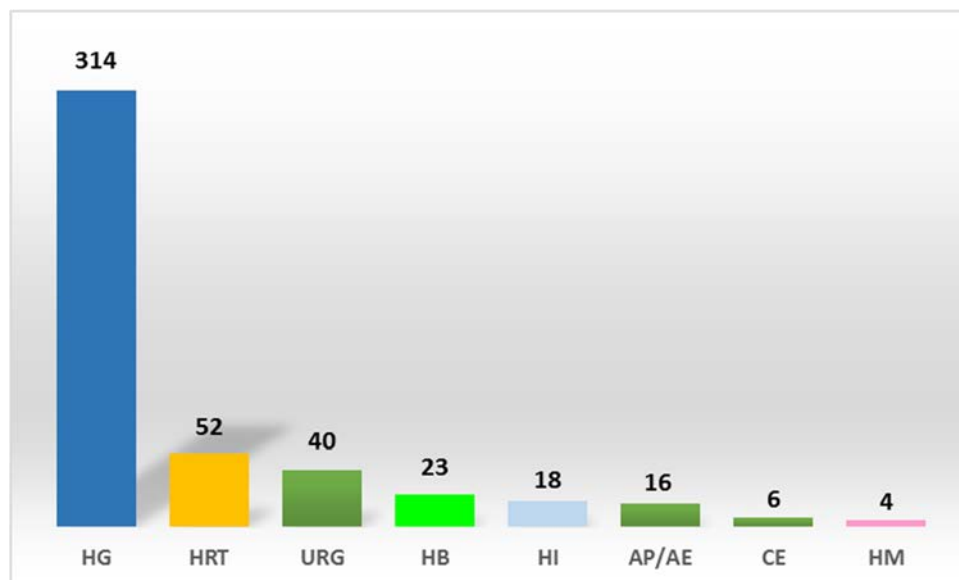


Figura 12. Distribución de casos por procedencias. HG: Hospital General, HRT: Hospital de Rehabilitación y Traumatología, URG: Urgencias, HB: Hospital de Cantoblanco, HI: Hospital Infantil, AP/AE: Atención Primaria/Atención Especializada Ambulatoria, CE: Consultas Externas, HM: Hospital Maternal.

En total hubo 37 unidades de hospitalización afectadas, de manera global fueron las Unidades Médicas del Hospital General las que tuvieron más casos con 138 pacientes en total (Figura 13), y dentro de éstas fue la Unidad de Hematología (G06D) la que registró más casos, seguida de una planta de Medicina Interna (G13C) y Oncología/Cuidados Paliativos (G14C). En segundo lugar fueron las Unidades Quirúrgicas con 82 pacientes, siendo la unidad de hospitalización de pacientes de Cirugía Vascular y Neurocirugía (G02C) la que tuvo más casos. La unidad que tuvo más casos incidentes fue la UCI médica (G01I) con 54 casos. Por el contrario, hubo casos esporádicos en la Unidad de Neurología (G11C) del Hospital General, en el Hospital



Maternal y en las Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos (IV02) y Nefrología y Hepatología del Hospital Infantil (M07C), aunque éstos últimos junto con los 15 casos de la unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (IV05) formaron parte del mismo brote.

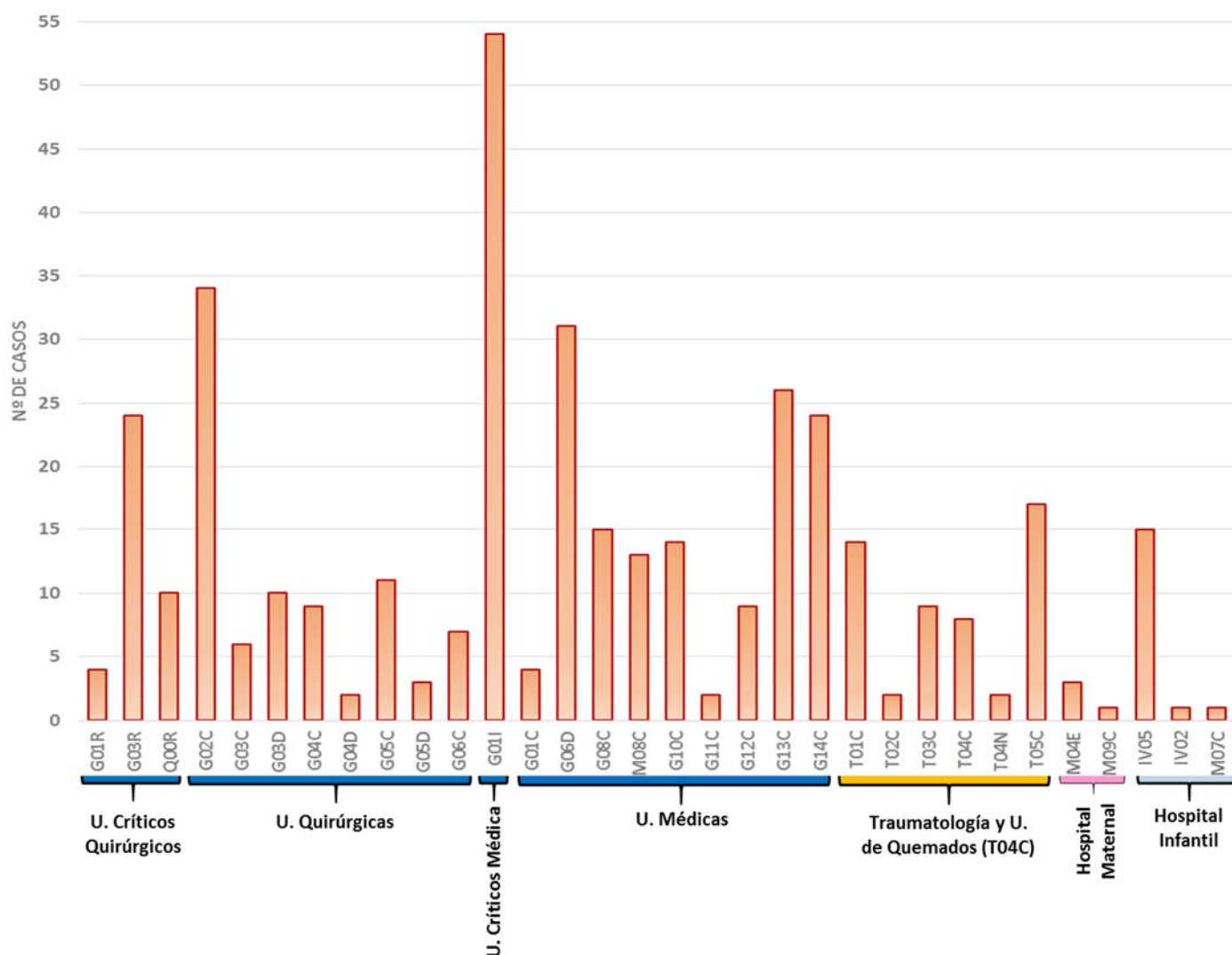


Figura 13. Distribución de casos por GFH de las unidades de hospitalización médicas, quirúrgicas y unidades de críticos en el Hospital General (azul oscuro), Hospital de Rehabilitación y Traumatología (amarillo), Hospital Maternal (rosa) y Hospital Infantil (azul claro).

### **3. Estructura del brote**

El brote muestra, ya desde el inicio, una estructura multifocal muy dispersa, con aparición de pequeños brotes a lo largo del tiempo en las distintas unidades del hospital en la que se alternan periodos con y sin casos (Figura 14). En cada momento se observan varias unidades afectadas, sin que se observe un patrón obvio de sucesión o dispersión entre unidades.

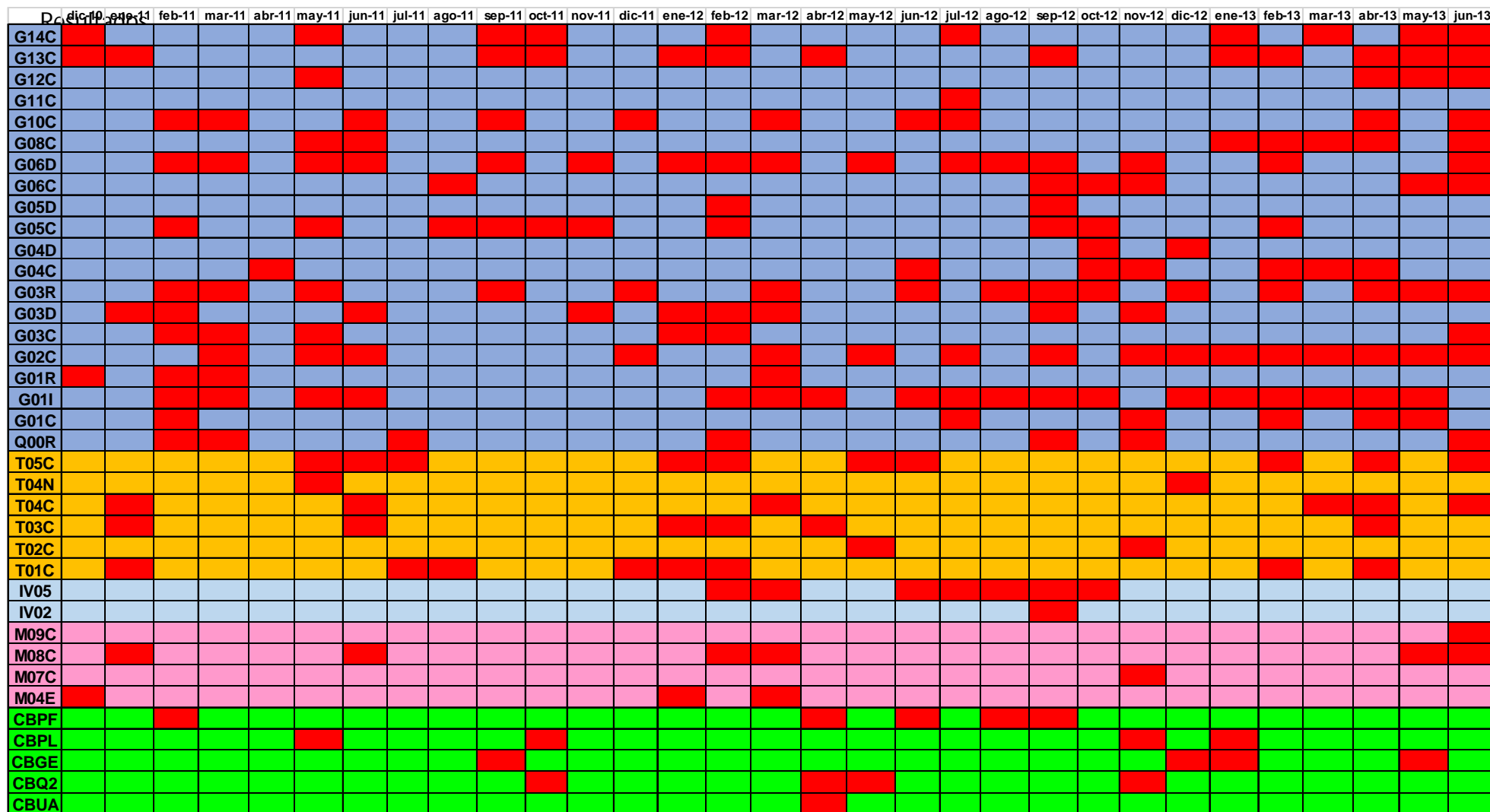


Figura 14. Estructura del brote en los distintos GFH a lo largo del tiempo en el Hospital General (G14C-Q00R), Hospital de Rehabilitación y Traumatología (T05C-T01C), Hospital Infantil (IV05-IV02), Hospital Maternal (M09C-M04E) y Hospital de Cantoblanco (CBPF-CBUA). Las cuadrículas de color rojo indican al menos un caso de infección o colonización por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.

### **3.1. Incidencia en las Unidades de Hospitalización del Hospital Universitario La Paz**

A continuación se desglosa el número de casos de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 a lo largo del tiempo en los distintos GFHs de los servicios médicos, quirúrgicos y unidades de críticos de todo el complejo hospitalario: Hospital General, Hospital de Traumatología, Hospital Maternal, Hospital Infantil y Hospital Cantoblanco. En un intento de simplificar y debido a que el centro tiene una distribución y organización compleja, se han representado en una misma gráfica aquellos GFH que constituyen el mismo servicio, comparten circuitos asistenciales, comparten personal ya sea facultativo o de enfermería, y entre las que se producen traslados internos frecuentes de pacientes. Por este mismo motivo se han eliminado de las gráficas aquellos GFH con menos de dos casos incidentes durante el periodo de estudio, apareciendo señalado en el texto.

#### **3.1.1. Servicios médicos del Hospital General**

A excepción de psiquiatría, durante el periodo de estudio se objetivaron casos incidentes en todos los GFHs de hospitalización pertenecientes a servicios médicos del Hospital General. De éstos, el Servicio de Neurología fue uno de los menos afectados contabilizándose sólo dos casos. El Servicio de Aparato Digestivo está representado en la figura 19, junto con el Servicio de Cirugía General, debido a su proximidad espacial dentro del hospital más que por motivos asistenciales. El Servicio de Nefrología se ha representado en el apartado 3.1.4 junto con el Servicio de Cirugía Vascular por estar ambos muy relacionados desde el punto de vista asistencial con traslado frecuente de pacientes entre ambas unidades.

El Servicio de Medicina Interna se encuentra repartido en tres plantas, dos ubicadas en el Hospital General (G10C y G13C) y una tercera en el Hospital Maternal (M08C). Estas plantas comparten personal facultativo de forma puntual y el traslado interno de pacientes entre las tres zonas es infrecuente. El mayor número de casos se produjo en el GFH G13C con 26 pacientes en total (Figura 15).

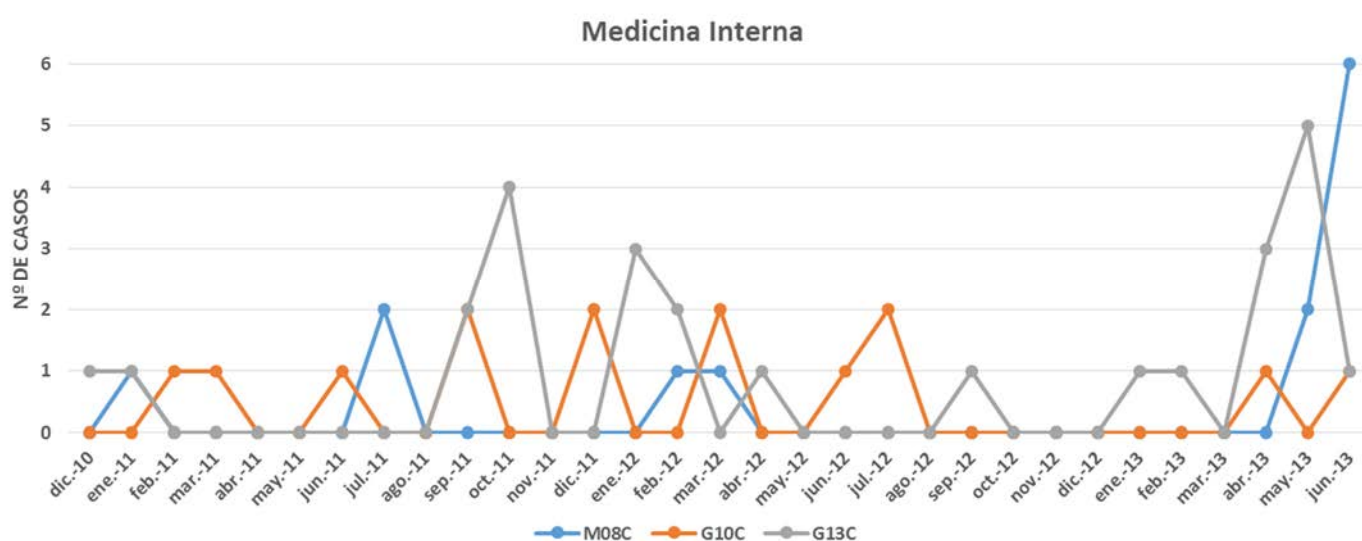


Figura 15. Incidencia en los tres GFH que constituyen el Servicio de Medicina Interna.

Todos los casos incidentes (Figura 16) pertenecientes al Servicio de Neumología fueron diagnosticados en muestras de colonización no detectándose ningún caso en muestra clínica durante el periodo de estudio.

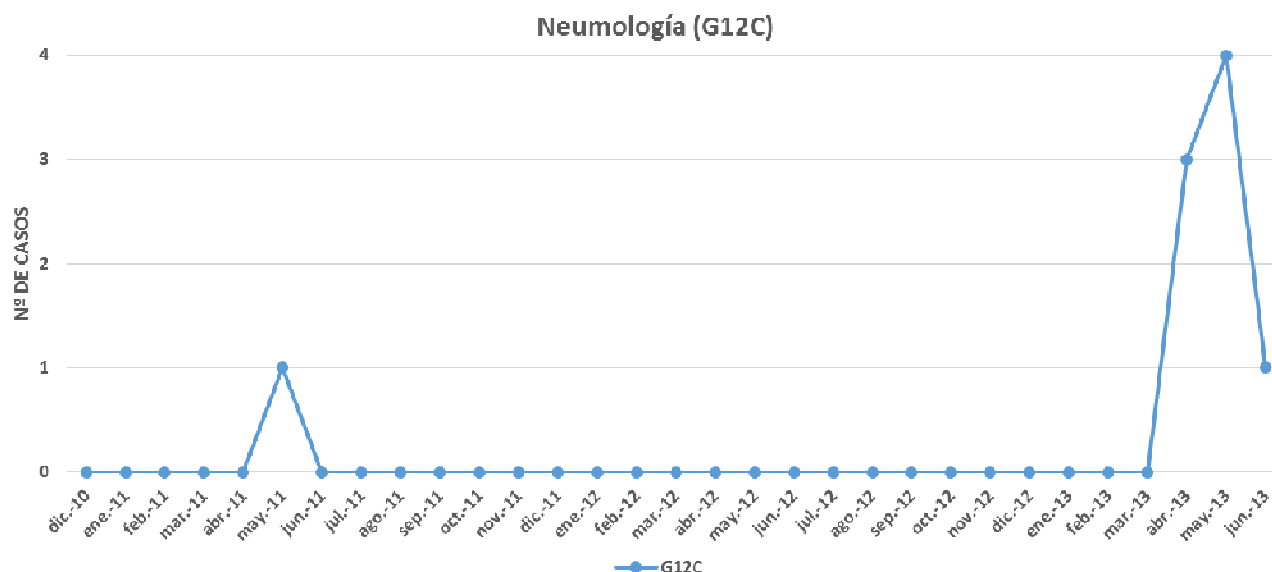


Figura 16. Incidencia en Neumología.

Las unidades de Hematología (G06D) y Oncología/Cuidados Paliativos (G14C y G05D) se han representado en un mismo gráfico por tratarse de unidades en las que ingresan una proporción considerable de pacientes con mayor o menor grado de inmunosupresión. Existe vínculo asistencial entre G14C y G05D, pero no ocurre así en la Unidad de Hematología (G06D) que constituye en general una unidad aislada y son escasos los traslados internos con otras unidades del hospital, pese a ello la Unidad de Hematología ha sido una de las que más casos ha registrado con un total de 30 pacientes (Figura 17).

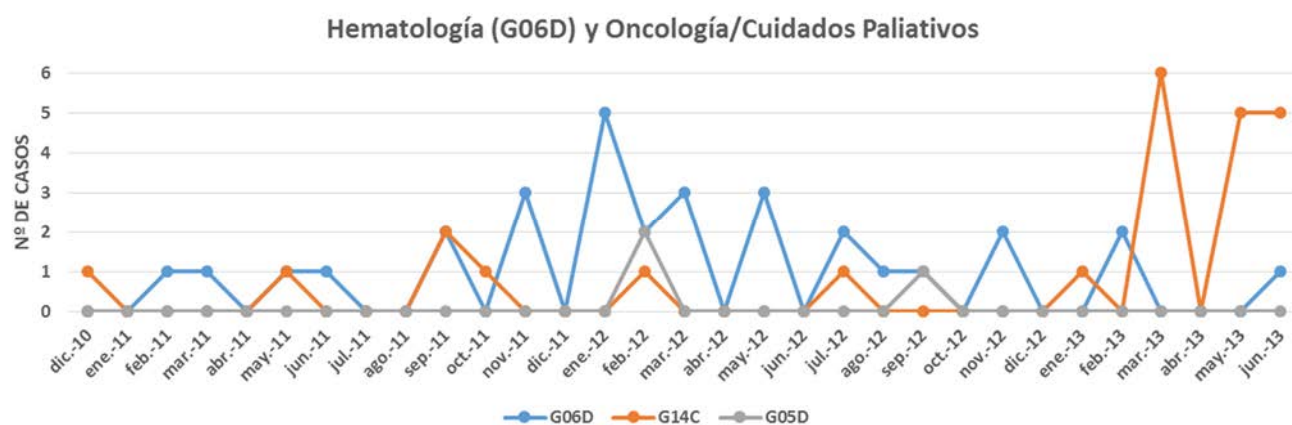


Figura 17. Incidencia en unidades con pacientes inmunodeprimidos.

Las unidades de Cardiología y Reanimación Cardíaca tienen un estrecho circuito asistencial con traslados internos de pacientes frecuentes y se encuentran ubicadas en la misma planta. Aunque los casos registrados en cada unidad por separado son esporádicos (Figura 18), en la Unidad de Reanimación Cardíaca es donde se diagnosticó uno de los primeros casos en un paciente intervenido por una valvulopatía.

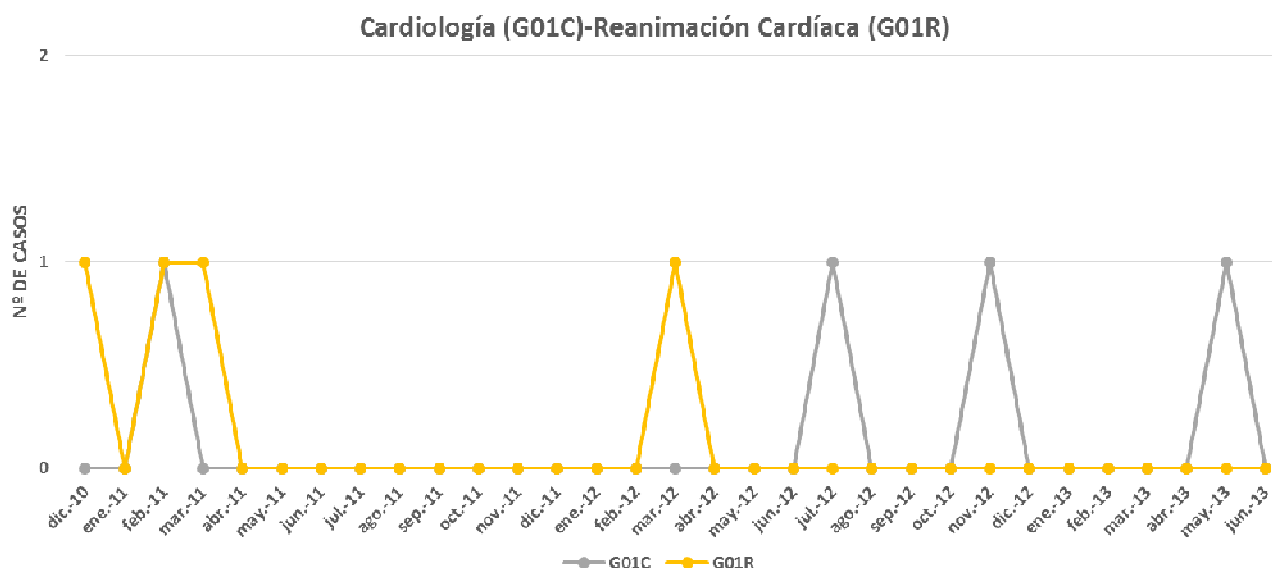


Figura 18. Incidencia en la denominada Área del Corazón.

### 3.1.2. Servicios quirúrgicos del Hospital General

Durante el periodo de estudio no hubo muestras incidentes en pacientes a cargo del servicio de Cirugía Maxilofacial. El servicio de Otorrinolaringología no está representado al haber registrado sólo 2 casos.

El Servicio de Cirugía General está compuesto por 4 GFHs que comprenden 3 unidades: coloproctológica, hepatobiliar y esófago-gástrica. En la figura 19 están representados los GFHs en los que hubo más de 2 casos incidentes junto con la Unidad de Aparato Digestivo.

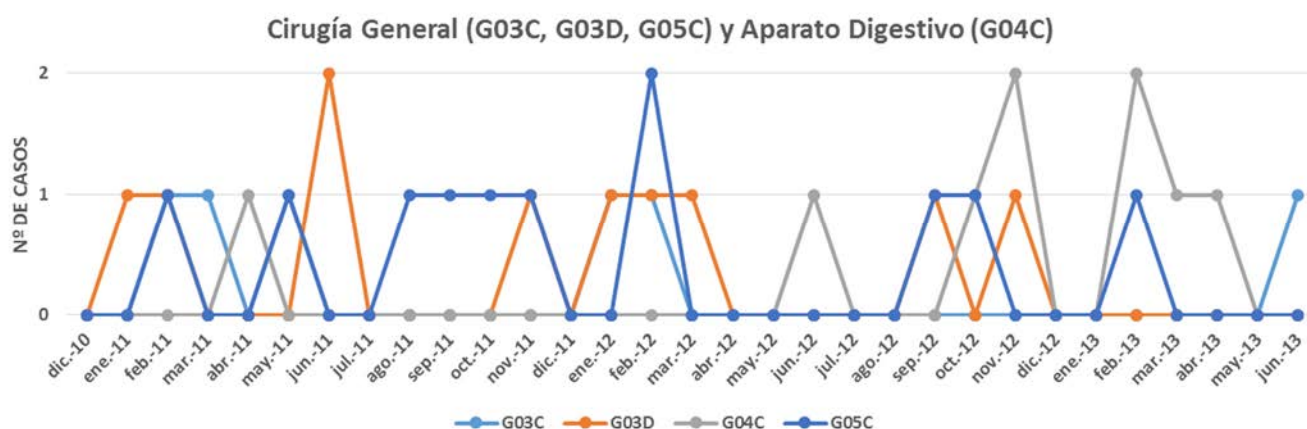


Figura 19. Incidencia en los servicios de Cirugía General y Aparato Digestivo.

Una parte de los pacientes atendidos en las unidades de pacientes críticos quirúrgicos representados en la siguiente figura (Figura 20) han estado en algún momento de su ingreso a cargo de las unidades de Cirugía General que aparecen en la figura anterior (Figura 19).



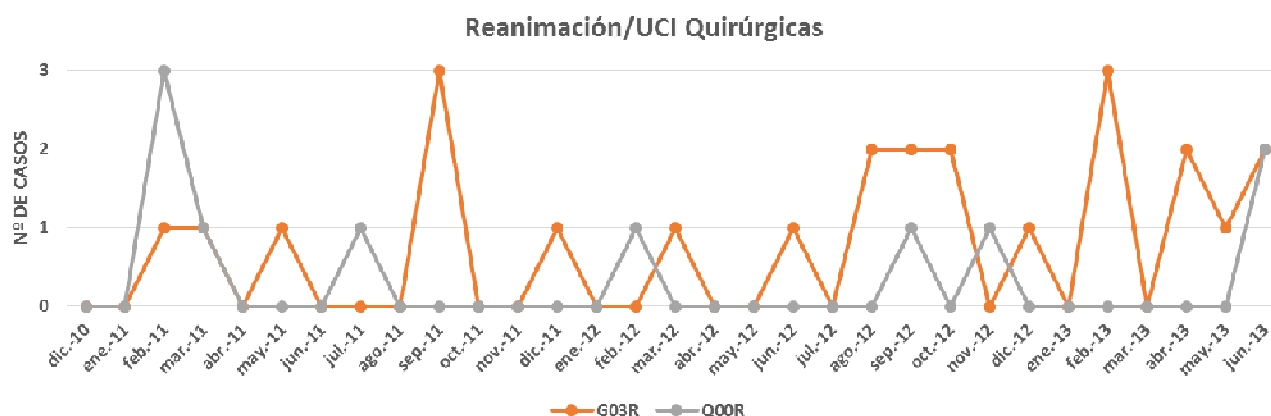


Figura 20. Incidencia en las unidades de pacientes críticos quirúrgicos.

Los servicios de Urología y Cirugía Cardiotorácica se encuentran ubicados en el mismo GFH (Figura 21) y comparten personal de enfermería. De los 7 pacientes con algún aislamiento de enterobacteria productora de carbapenemasa OXA-48 ubicados en esta planta, indicar que los 4 últimos estaban a cargo de urología, 2 eran tratados por cirugía cardiotorácica y el segundo caso que aparece en la figura era un paciente ectópico a cargo de cirugía general.

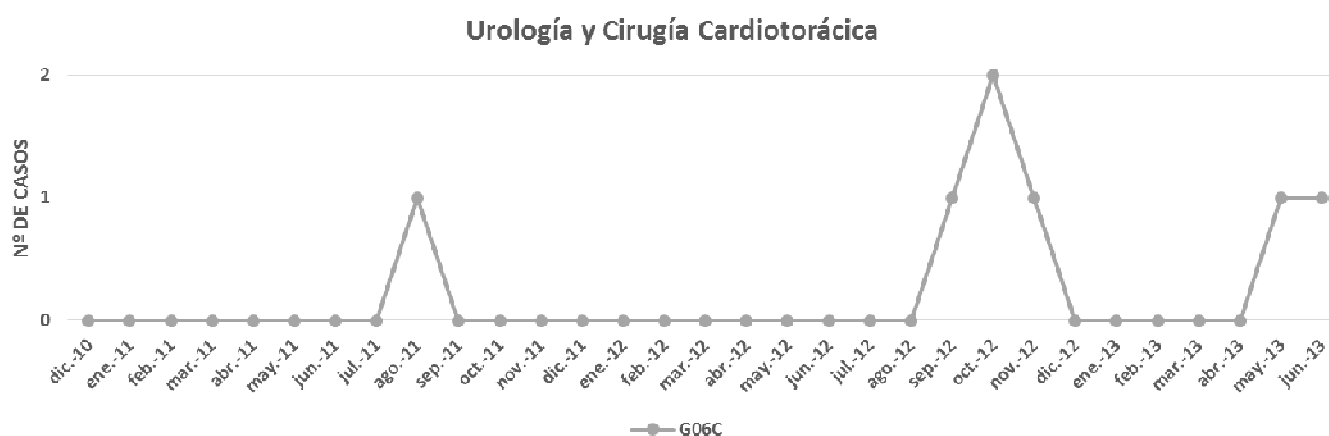


Figura 21. Incidencia en los servicios de Urología y Cirugía Cardiotorácica.

### 3.1.3. Unidad de Críticos Médica y Unidad de Quemados Críticos

La UCI médica es la unidad que más casos registró durante todo el periodo que recoge el estudio, fundamentalmente durante la segunda mitad, en la que se observa una situación de brote mantenido (Figura 22). Estas unidades que atienden pacientes críticos se encuentran en distintos edificios del hospital pero comparten personal médico facultativo, además en el GFH T04C realizan su labor asistencial personal facultativo de Medicina Intensiva y Cirugía Plástica (T4N), éste último GFH no está representado en la figura por haberse registrado sólo 2 casos. El traslado de pacientes entre las unidades de Críticos Médica y la Unidad de Quemados Críticos es ocasional pero ocurre cuando existen problemas de ocupación de camas.

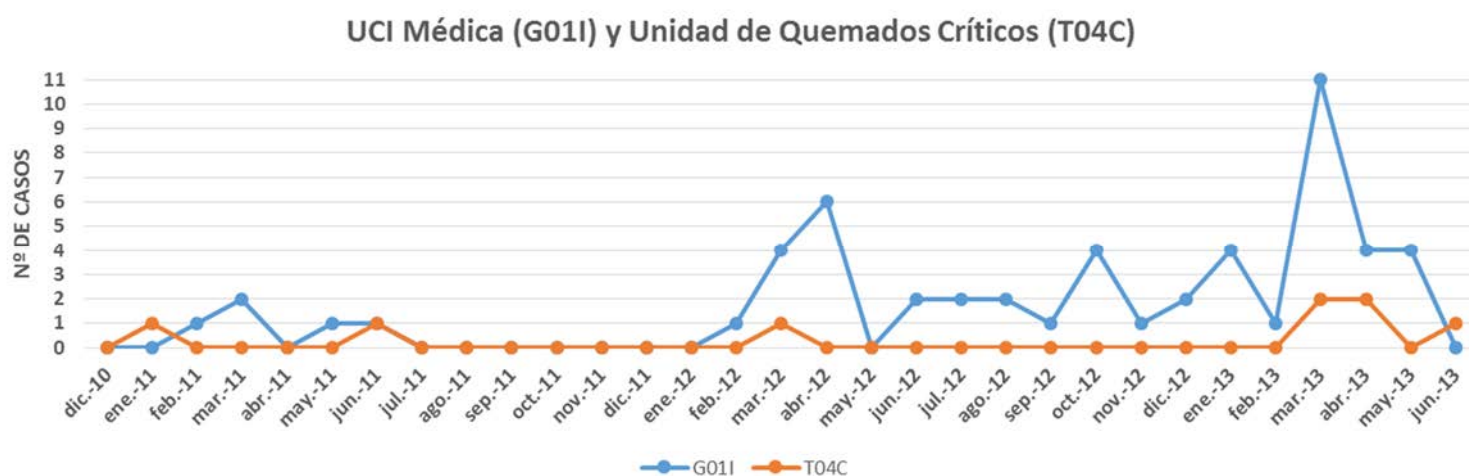


Figura 22. Incidencia en la UCI Médica y Unidad de Quemados Críticos.

### 3.1.4. Nefrología, Cirugía Vascular y Neurocirugía del Hospital General

Estos servicios se han representado en el mismo gráfico por pertenecer al mismo GFH en el caso de Cirugía Vascular y Neurocirugía y por el circuito asistencial que existe entre cirugía vascular y nefrología en la búsqueda de accesos vasculares en los pacientes candidatos a recibir hemodiálisis (realización de fístula arterio-venosa interna o colocación de

prótesis arterio-venosa). En la figura 23 se muestra el GFH G02C (casos totales en línea gris) que comprende los dos servicios: Cirugía Vascular (barra naranja) y Neurocirugía (barra azul). Ambos servicios comparten espacio físico y personal de enfermería; sin embargo, la mayoría de los casos incidentes atendidos en este GFH pertenecían al servicio de Cirugía Vascular (27 pacientes; 79,4% sobre el total de casos en G02C).

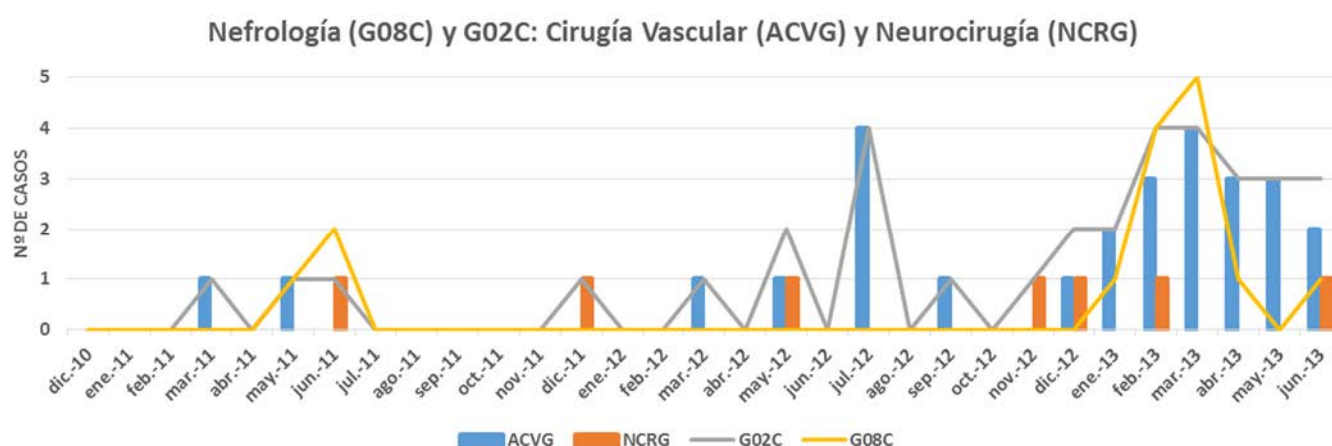


Figura 23. Incidencia en nefrología y en los servicios de neurocirugía (NCRG) y cirugía vascular (ACVG) que se encuentran ubicados en el mismo GFH (G02C).

### 3.1.5. Hospital de Traumatología y Rehabilitación

Los casos incidentes en el Hospital de Traumatología y Rehabilitación tenían una mediana de edad de 78 años (rango: 36-92), siendo pacientes que habitualmente presentan otras comorbilidades y están a cargo de equipos multidisciplinares que incluyen otros servicios como Medicina Interna o Geriátrica. En la figura 24 no están representados los GFH ubicados en este hospital T04C por estar referidos en la figura 22 y T02C por haberse registrado sólo 2 casos.

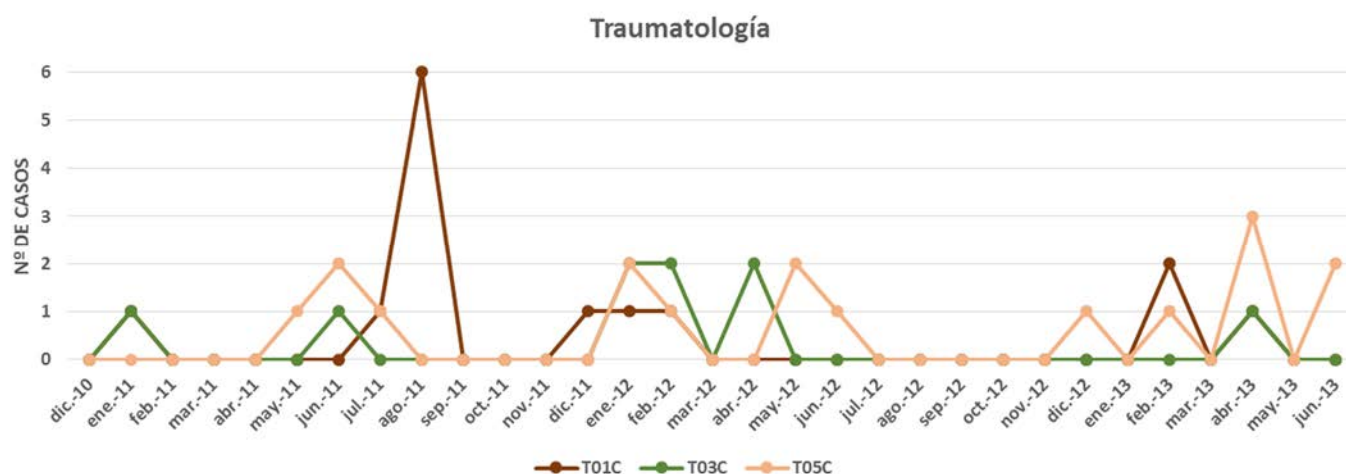


Figura 24. Incidencia en el Hospital de Traumatología y Rehabilitación.

### 3.1.6. Hospital Maternal y Hospital Infantil

El Hospital Maternal fue uno de los primeros en los que se detectaron casos (Figura 25); sin embargo, el origen de este caso no se debió a una paciente con patología ginecológica; sino a una paciente intervenida de una neoformación gástrica a la que se le realizó una gastrectomía parcial y linfadenectomía, que al no poder ser ingresada en las unidades de críticos quirúrgicos habituales por falta de camas, fue trasladada a reanimación del Hospital Maternal que dispone de dos camas para pacientes críticos.

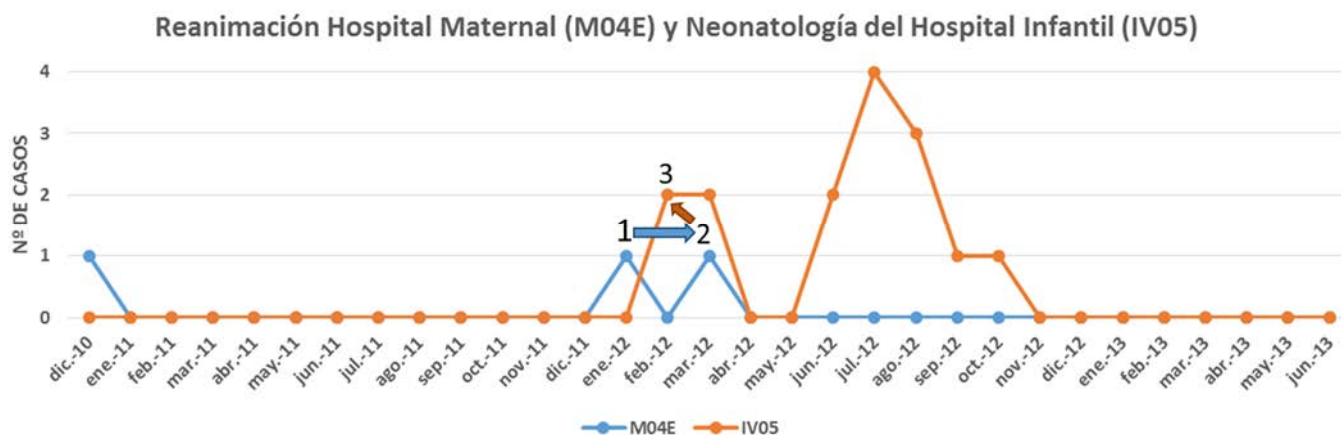


Figura 25. Incidencia en la unidad de Reanimación del Hospital Maternal y Neonatología del Hospital Infantil con la hipotética secuencia de transmisión del primer caso ocurrido en el Hospital Infantil. Los números representan el verdadero orden cronológico en la cadena de transmisión.

Motivos similares ocasionaron la entrada y el brote de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el Hospital Infantil: una paciente diagnosticada con anterioridad e ingresada en el Hospital de Traumatología por una fractura de cadera complicada y perforación intestinal, tuvo que ser trasladada por motivos de ocupación a una de las camas de críticos de reanimación del Hospital Maternal por empeoramiento de su estado general, coincidiendo en el tiempo con el caso número 1 (Figura 25), cuyo motivo de ingreso fue un parto gemelar con hemorragia obstétrica, éste a su vez coincidió con el caso número 2 que ingresó unas horas tras la realización de una cesárea y que a su vez había dado a luz al paciente número 3, el cual necesitó ingreso en cuidados intensivos neonatales por prematuridad, hemorragia intraventricular y sepsis por *L. monocytogenes*, aislándose *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 en una muestra de piel pericatéter. El caso número 2 se diagnosticó en una muestra de colonización rectal que le fue solicitada después de ser dada de alta. La tipificación molecular de los aislados de *K.*

*pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 aisladas en estos pacientes se agruparon con el denominado clon 11 obtenido por Diversilab™, que hasta ese momento (primer trimestre de 2012) constituía un clon minoritario (Figura 31). Aunque el brote en Cuidados Intensivos Neonatales originó casos secundarios en otras unidades del Hospital Infantil: Trasplante Hepático y Nefrología (dos casos) y Cuidados Intensivos Pediátricos (un caso), pudo ser controlado de forma definitiva. Finalmente hubo un caso esporádico en una planta de hospitalización de ginecología (M09C) del Hospital Maternal en una paciente previamente ingresada en medicina interna (M08C).

### 3.1.7. Hospital Cantoblanco

La gráfica que representa la incidencia en todo el Hospital de Cantoblanco (Figura 26) en realidad engloba 5 GFH distintos (ver figura 14 en la sección de resultados), los cuales abarcan las especialidades de Medicina Interna, Geriátrica, Rehabilitación y Traumatología y Neumología. El pico epidémico en abril de 2012 se debió fundamentalmente a pacientes que se encontraban a cargo de neumología.

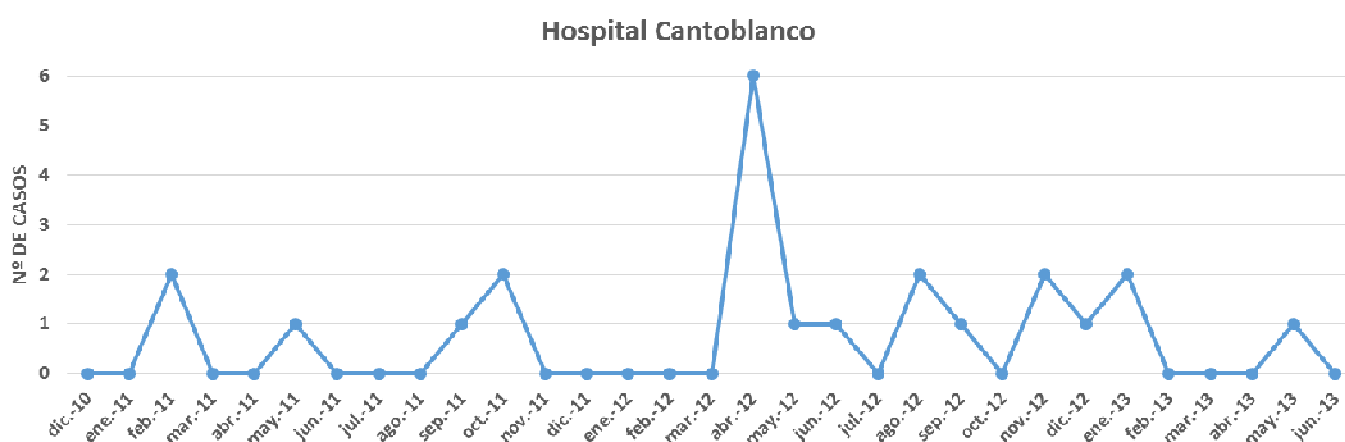


Figura 26. Incidencia en el Hospital Cantoblanco.

#### 4. Características demográficas, epidemiológicas y clínicas

Durante el periodo de estudio se identificaron 473 pacientes infectados y/o colonizados de los cuales 278 (58,7%) eran hombres. La mediana de edad fue de 72 años (rango: 0-98). La distribución por edades y sexos está representada en la figura 27. Los casos que comprenden el rango de edad entre 0 y 4 años son los relacionados con un brote ocurrido en el Hospital Infantil desde febrero hasta noviembre del 2012.

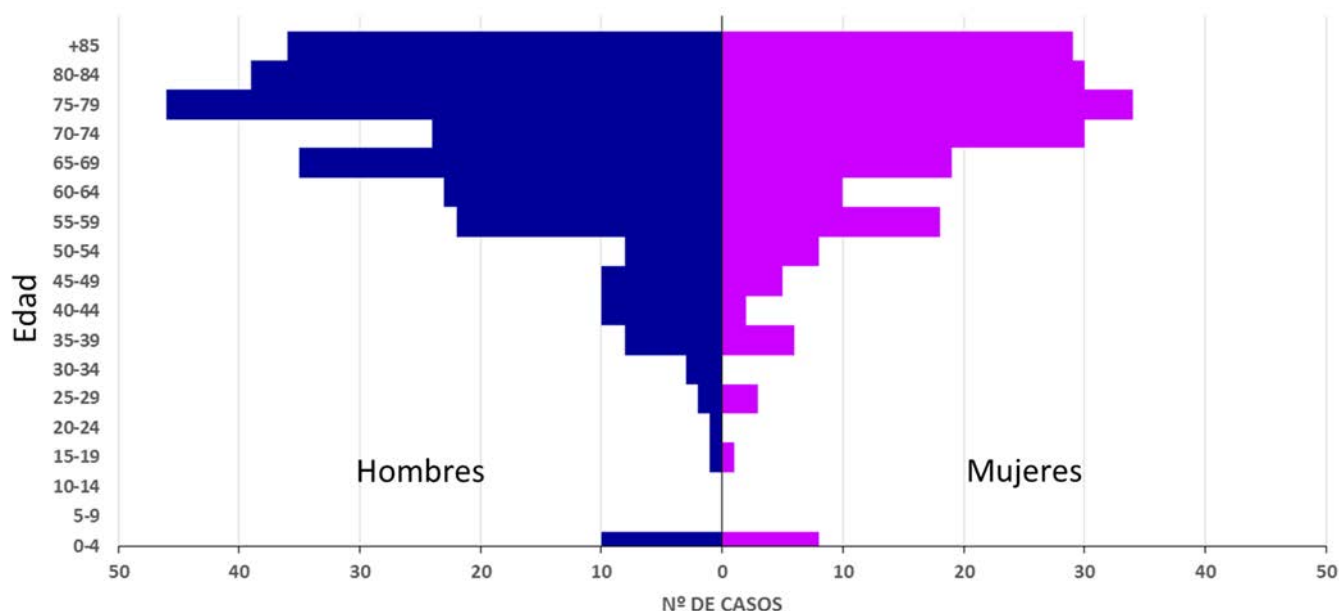


Figura 27. Pirámide de población de los pacientes infectados/colonizados por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.

Conforme el brote fue progresando aumentó la incidencia en las muestras de colonización como se muestra en la figura 28, donde está representada la distribución temporal en función del tipo de muestra en la que se realizó el diagnóstico o primera muestra incidente (muestras clínicas

*versus* muestras de colonización). Cabe reseñar que mientras los criterios y la metodología de los aislamientos clínicos se mantuvieron constantes en el tiempo, los criterios para la realización de cribados de vigilancia epidemiológica fueron variando e incrementándose como respuesta al brote.

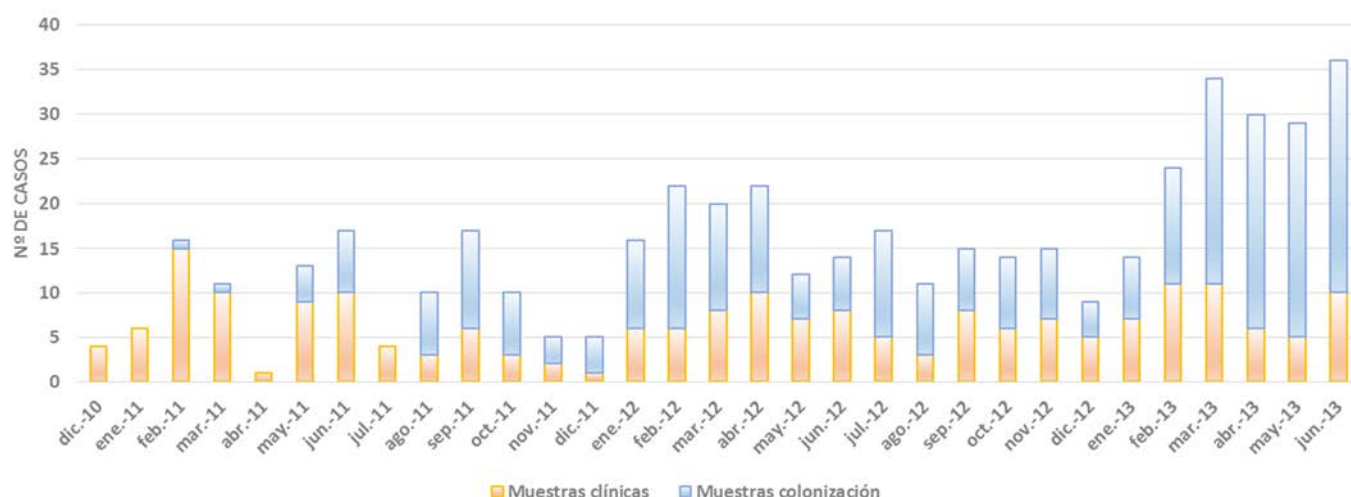


Figura 28. Distribución temporal de la primera muestra incidente: muestras clínicas y muestras de colonización.

En los 473 pacientes se obtuvieron un total de 1.581 muestras de las que 1.021 correspondieron a muestras de colonización (64,6%) y 560 a muestras clínicas (35,4%). Las muestras clínicas en las que se aislaron enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 con mayor frecuencia fueron las muestras de origen urinario (Tabla 21) seguidas de las muestras quirúrgicas y las de origen endovascular (hemocultivos y catéteres).



Tabla 21. Distribución de los aislados según el tipo de muestras clínicas. El porcentaje está calculado sobre el total de muestras clínicas con aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.

Origen	Aislados (n)	%
Urinario	212	37,9%
Quirúrgicas	129	23%
Endovasculares	115	20,5%
Respiratorias	70	12,5%
Piel y partes blandas	31	5,5%
Sistema nervioso central (LCR)	2	0,3%
Ojos (conjuntival)	1	0,2%

Sin embargo, fueron las muestras de colonización las que con mayor frecuencia sirvieron para el diagnóstico o fueron primera muestra incidente, seguidas de las muestras de orina (Tabla 22), muestras quirúrgicas y las de origen endovascular:

Tabla 22. Distribución según el tipo de muestra en el que se obtuvo el primer aislado o primera muestra incidente. El porcentaje está calculado sobre el total de pacientes con aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48

Origen	Aislados (n)	%
Colonización	271	57,3%
Urinario	84	17,8%
Quirúrgicas	45	9,5%
Endovasculares	44	9,3%
Respiratorias	18	3,8%
Piel y partes blandas	9	1,9%
Sistema nervioso central (LCR)	1	0,2%
Ojos (conjuntival)	1	0,2%

En 93 (19,6%) pacientes se produjeron bacteriemias y en 40 (8,5%) fue la bacteriemia la primera muestra incidente. Dos pacientes tuvieron muestras positivas en LCR, en el primer caso se trataba de un paciente diagnosticado de cáncer de recto en estadio IV con metástasis pulmonar al que se le colocó una bomba intratecal para el control del dolor. Veintiocho días después ingresó con disminución del nivel de conciencia aislándose *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 tanto en el LCR como en las conexiones de la bomba de infusión; siendo el cuadro de meningoencefalitis la causa inmediata del *exitus* en el día 19º después del ingreso. El segundo caso se presentó en un paciente con síndrome de hipertensión craneal secundario a hemorragia subaracnoidea al que se le

colocó una válvula ventricular externa, en el día 13º posterior a la colocación de la válvula se objetiva una ventriculitis con criterios de sepsis grave y cultivo positivo para *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 en el LCR. Otras muestras de líquidos habitualmente estériles en las que se obtuvieron cultivos positivos fueron: líquido peritoneal o ascítico (14 pacientes), bilis (4 pacientes) y líquido pleural (1 paciente).

Durante el periodo de estudio se procesaron 16.864 muestras de colonización para la detección de bacterias gramnegativas multirresistentes correspondientes a 3.921 pacientes. En 332 pacientes se obtuvieron cultivos positivos para enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en muestras de colonización, lo que supone un rendimiento (referido exclusivamente a los pacientes a los que se les había realizado estudios de colonización) de un 8,5% y de un 6,9% (n=271) si consideramos únicamente a los pacientes que tuvieron muestras de colonización positivas y aquellos en los que la muestra de colonización fue la primera muestra incidente. En 206 pacientes sólo se objetivó la presencia de bacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en los cultivos de colonización (43,5% sobre el total de pacientes). De éstos, un 84,9% (n=175) tenían solicitadas muestras clínicas (urocultivos, hemocultivos, muestras quirúrgicas o respiratorias) en el mismo ingreso en el que se realizó el diagnóstico en la muestra de colonización. En 127 pacientes (26,8% sobre el total) se objetivó la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 tanto en muestras de colonización como en muestras clínicas, de éstos, en el 45,7% la colonización pudo documentarse previamente a la infección.

Se recogieron de manera retrospectiva datos clínicos y epidemiológicos de los primeros 80 pacientes con aislamientos de

enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en muestras clínicas (86) y los primeros 40 pacientes con bacteriemia (87). En el primer estudio se observó que el 83,1% de los pacientes habían recibido tratamiento antibiótico en los dos meses previos a la infección y que el 42,2% este antibiótico había sido un carbapenémico. En el 33% la presentación clínica fue en forma de shock séptico o sepsis severa y la mortalidad cruda durante el ingreso fue de un 43,5%. La mediana de tiempo desde el ingreso hasta la detección en la primera muestra clínica fue de 29,5 días (rango: 2-167). En el estudio de bacteriemias los pacientes presentaban comorbilidades de manera frecuente, siendo en un 57,5% de origen tumoral. El 60% habían sido sometidos al menos a una intervención quirúrgica, el 27% tenía sonda urinaria y el 20% un catéter venoso central, siendo el origen más frecuente de la bacteriemia la infección del tracto urinario seguida de la infección profunda de herida quirúrgica intraabdominal. En el 67,5% la presentación clínica fue de sepsis, siendo en el 45% en forma de sepsis grave o shock séptico y la mortalidad cruda durante el ingreso del 65%. En el 57,7% de los pacientes que fallecieron la mortalidad fue atribuible al episodio de bacteriemia. La mediana de tiempo desde el ingreso hasta la detección de la bacteriemia fue de 46,6 días (rango: 2-188).

En 60 casos, 22,8% sobre el total de pacientes infectados o con aislamientos en muestras clínicas, el primer episodio de infección correspondió a pacientes no hospitalizados y cuyas muestras procedían de atención primaria, atención especializada ambulatoria o de urgencias; considerándose infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 de inicio comunitario. Cuarenta y uno de estos casos eran de pacientes ingresados en urgencias. La muestra que sirvió de

diagnóstico para este tipo de casos o primera muestra incidente fue en su mayoría la orina con 45 pacientes, seguida del hemocultivo con nueve pacientes procedentes todos del Servicio de Urgencias del Hospital General. Sólo en cinco pacientes se conocía el estado de portador previo a la infección de inicio comunitario. A todos los casos se les consideró como infecciones relacionadas con los cuidados sanitarios al haber tenido en su mayoría ingresos previos en el Hospital la Paz (n=47 pacientes), Hospital de Cantoblanco (n=7), en otros hospitales de la Comunidad de Madrid (n=1) o fuera de ella (n=1). Dos pacientes procedían de una misma residencia y otros dos no tenían antecedentes de haber estado ingresados pero habían recibido tratamientos en centros de día, consultas externas o rehabilitación.

## **5. Aislados bacterianos**

El número de aislados bacterianos obtenidos en un mismo paciente puede estar influenciado por la cantidad de muestras que se le soliciten, y esto a su vez depende de la situación clínica del paciente, el servicio del que dependa y la planta de ingreso (si se hacen o no estudios de colonización de manera habitual). Por este motivo cada especie bacteriana se ha contabilizado una sola vez para cada paciente, sin tener en cuenta todos los aislados que tuviera de esa misma especie. De manera global, la especie aislada con mayor frecuencia tanto en muestras clínicas como en muestras de colonización fue *K. pneumoniae* (90,2%) seguido de *E. coli* (5,6%). Las frecuencias de las distintas especies de enterobacterias en muestras clínicas y en muestras de colonización están representada en la tabla 23.

Tabla 23. Proporción de especies bacterianas en muestras clínicas y de colonización. Cada especie bacteriana se ha contabilizado una sola vez por paciente.

	Muestras Clínicas		Muestras Colonización	
	Aislados (n)	%	Aislados (n)	%
<i>K. pneumoniae</i>	253	90	310	90,4
<i>E. coli</i>	19	6,8	16	4,7
<i>E. cloacae</i> complex	3*	1,1	4**	1,2
<i>C. freundii</i>	0	-	7	2,0
<i>E. aerogenes</i>	2	0,7	4	1,2
<i>K. oxytoca</i>	1	0,4	0	-
<i>S. marcescens</i>	0	-	1	0,3
<i>P. mirabilis</i>	1	0,4	0	-
<i>M. morganii</i>	0	-	1	0,3

\**E. cloacae* complex: *E. cloacae* (n=2 aislados) y *E. kobei* (n=1). \*\**E. cloacae* complex: *E. cloacae* (n=3 aislados), *E. kobei* (n=2) y *E. asburiae* (n=1).

No se observó una diferencia significativa en la distribución de especies aisladas en muestras clínicas y en muestras de colonización, a excepción de *C. freundii* con siete casos que se encontraron exclusivamente en muestras de colonización y ninguno en muestras clínicas. La proporción de aislados de *E. coli* en muestras clínicas fue ligeramente superior a los encontrados en muestras de colonización. Se obtuvieron 25 aislados de *E. coli* procedentes de muestras clínicas en un total de 19 pacientes, a diferencia de lo observado en la distribución de muestras del análisis global, la mayoría de los aislados de *E. coli* procedían de muestras quirúrgicas (14 aislados en 11 pacientes), seguido de hemocultivos (5 aislados en 5 pacientes) y por último muestras de orina (4 aislados en 4 pacientes).

En 25 pacientes se aislaron distintas especies de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48, en ocho pacientes las distintas

enterobacterias se aislaron en el mismo momento en la misma muestra, seis de ellos se obtuvieron en muestras de origen quirúrgico y los dos restantes en muestras de colonización (faríngea y rectal).

En tres pacientes se obtuvieron en la misma muestra aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48 con distintos morfotipos de colonia y que correspondieron a diferentes perfiles de resistencia, en los tres casos se aislaron en muestras clínicas de origen quirúrgico siendo en uno de ellos una cepa productora de BLEE y la otra no.

Nueve pacientes tuvieron aislados con enterobacterias en las que se detectó, además del gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, el gen *bla*<sub>VIM</sub>. Todos ellos fueron detectados en muestras de colonización y sólo en un caso se aisló también en una muestra clínica de origen respiratorio. Las enterobacterias con co-producción de carbapenemasa tipo VIM fueron: *C. freundii* (n=4 pacientes), *K. pneumoniae* (n=3), *S. marcescens* (n=1) y *E. kobei* (n=1). Los primeros aislados en los que se demostró la co-producción de ambas carbapenemasas fueron en las cepas de *K. pneumoniae* en una planta de Medicina Interna y en la Unidad de Oncología/Cuidados Paliativos durante enero y febrero de 2012, posteriormente en mayo y junio de 2013 aparecieron cuatro casos de co-producción en los aislados de *C. freundii* en estas mismas plantas.

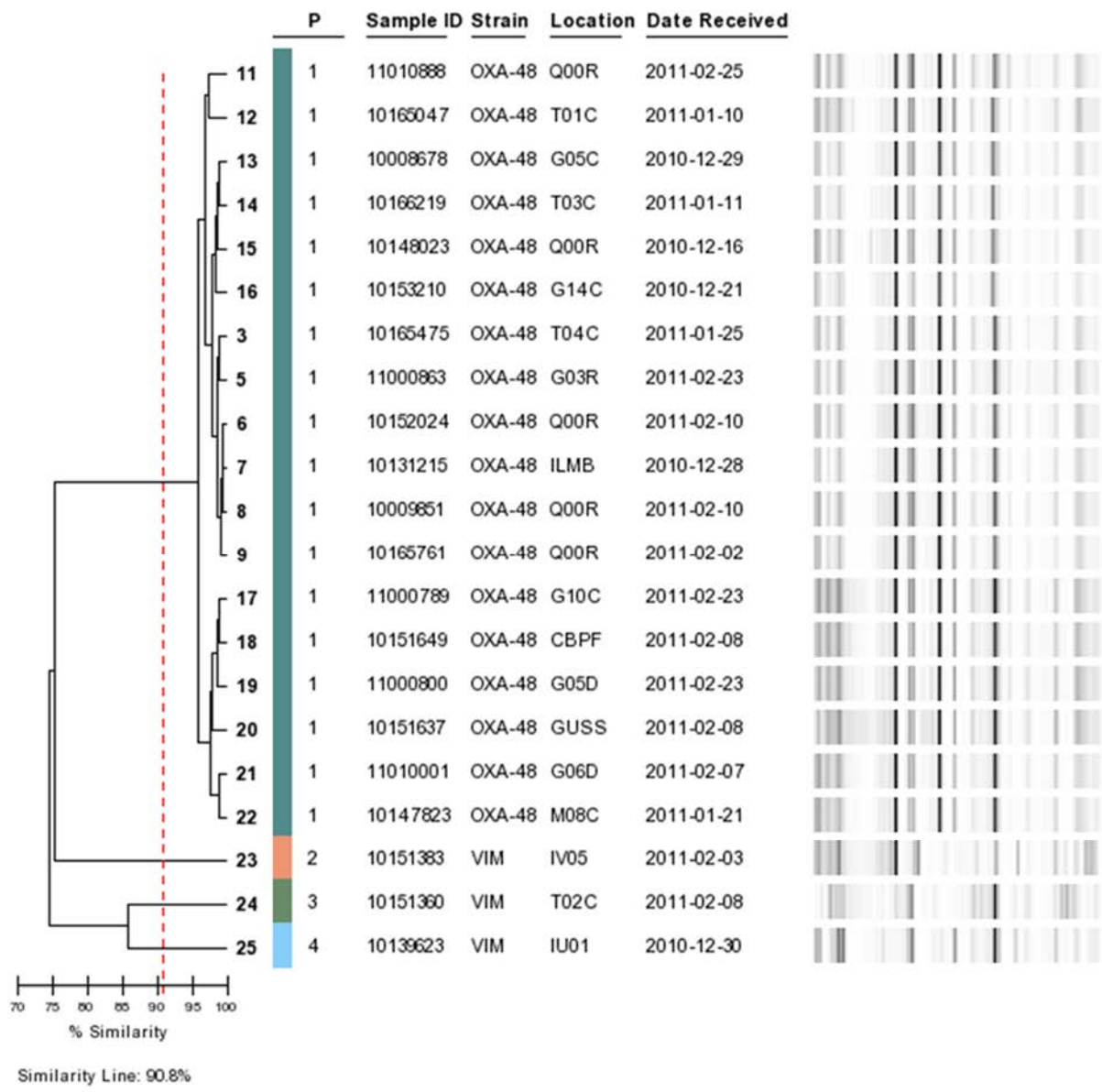
No se detectaron cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> y productoras de AmpC plasmídica.

## **6. Aislados clínicos y de colonización de *K. pneumoniae*: características poblacionales y genotípicas**

### **6.1. rep-PCR automatizada Diversilab™**

En una primera aproximación se estableció la relación clonal de los primeros casos de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 mediante RAPD (página 62). En una segunda fase se procedió a la caracterización mediante el sistema Diversilab™, sistema altamente estandarizado, que permite guardar los patrones de bandas obtenidos y compararlos con los de otras cepas que vayan apareciendo a lo largo del tiempo. En la figura 29 se muestran los resultados de la tipificación molecular al inicio del brote (diciembre del 2010 y enero y febrero del 2011), en los que se observa un único clon. Desde el año 2005 se venían registrando casos esporádicos de enterobacterias productoras de carbapenemasa tipo VIM en el Hospital Universitario La Paz (88), por lo que se compararon con tres cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa tipo VIM aisladas en las mismas fechas que las productoras de carbapenemasa OXA-48, objetivándose que no existía ninguna relación entre ellas.





29. Dendrograma de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapanemasa OXA-48 (perfil 1) y carbapanemasa tipo VIM (perfiles 2, 3 y 4).

Durante el periodo de estudio se analizaron 301 cepas y se obtuvieron 14 clones distintos que se numeraron sucesivamente en orden de aparición (aunque dos de ellos, 8 y 14, se incluyeron posteriormente dentro de otros clones anteriores). Hubo dos clones mayoritarios que englobaban más del 80% de los casos (denominados por orden de aparición

clon 1 y clon 11), el resto estaba constituido por clones con una frecuencia media (clones 5, 2, 4 y 9) y una serie de clones esporádicos (Figura 30).

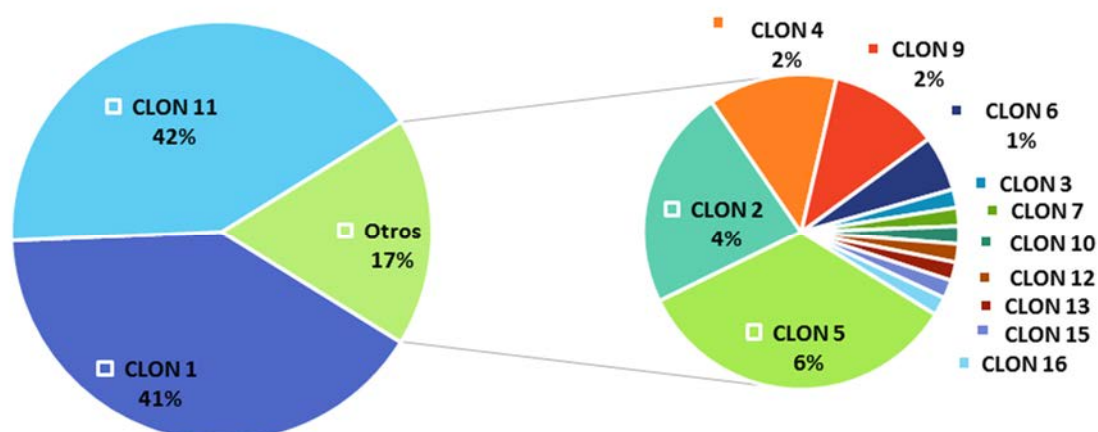


Figura 30. Frecuencias de los distintos clones de *K. pneumoniae* caracterizados durante el brote mediante rep-PCR automatizada con el sistema Diversilab™.

Los primeros casos detectados pertenecían al clon 1, que fue el clon predominante durante el primer año del brote; sin embargo, durante 2012 este clon fue siendo poco a poco desplazado por el clon 11, hasta llegar a convertirse éste último en el clon mayoritario en 2013 como se muestra en la figura 31. En esta misma figura puede observarse cómo la diversidad clonal se manifiesta precozmente, con la aparición de clones distintos al mayoritario a partir del tercer mes.

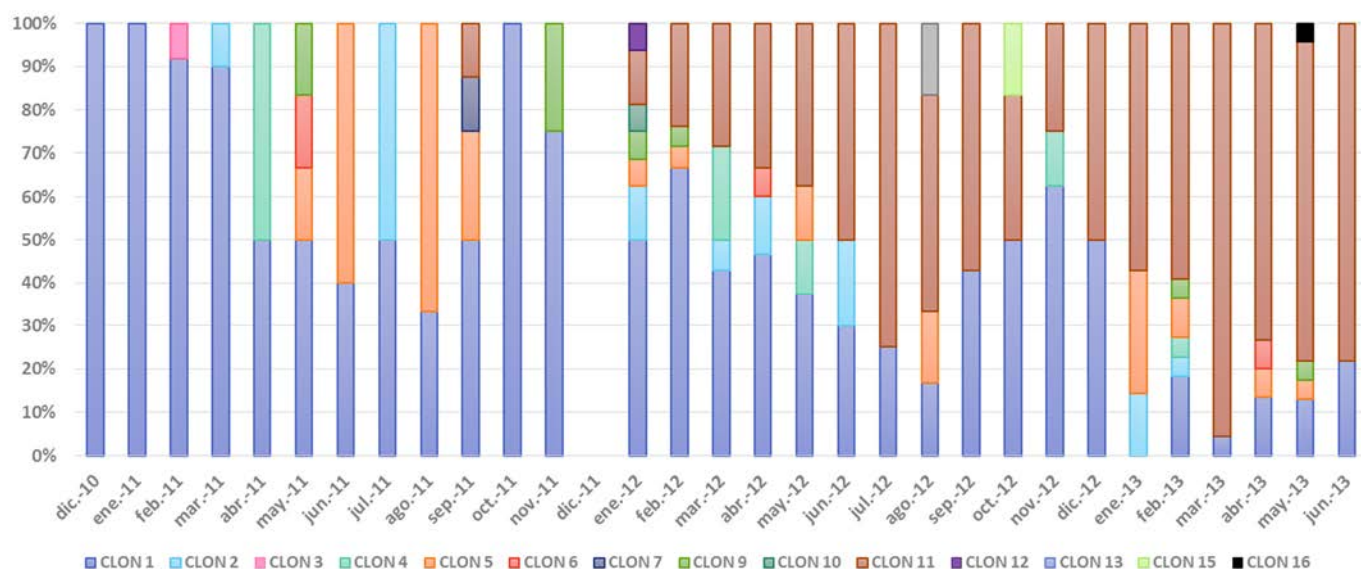


Figura 31. Estructura poblacional a lo largo del tiempo de los distintos clones de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 analizados mediante rep-PCR automatizada (Diversilab™). En el eje de ordenadas figura cual ha sido la proporción de los distintos clones con respecto al total de cepas incidentes y analizadas ese mes.

Analizando los clones obtenidos por Diversilab™ se observó una diversidad clonal ligeramente mayor en las muestras clínicas: 12 clones distintos, 4 de los cuales no se detectaron en las muestras de colonización; mientras que en las muestras procedentes de estudios de colonización se detectaron 10 clones distintos, de los que 2 no se detectaron en las muestras clínicas. Tanto los clones que estaban únicamente presentes en muestras clínicas (clones 3, 7, 13 y 15) como los que estaban exclusivamente presentes en muestras de colonización (clones 12 y 16) eran clones esporádicos con un único aislado. El denominado clon 5 fue el tercer clon más frecuente, con 18 casos y constituyendo el 6% del total de cepas caracterizadas. Diez de los pacientes en los que se aislaron cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes a este clon estaban o habían estado hospitalizados en plantas de cirugía o unidades de críticos quirúrgicos, sin

embargo la variedad de intervenciones quirúrgicas a las que habían sido sometidos (Esófago-gástrica, coloproctológica, hepatobiliar, vascular y trasplante renal) no permitió establecer un vínculo preciso entre los casos. Sólo hubo tres pacientes con aislados pertenecientes al clon 6, ninguna de estas cepas de *K. pneumoniae* eran productoras de BLEE. La tipificación molecular de los aislados de *K. pneumoniae* co-productoras de OXA-48 y VIM demostró que no estaban relacionadas, siendo las tres cepas distintas entre sí (clones 9, 11 y 12). En ocho pacientes se realizaron estudios de clonalidad con aislados procedentes de muestras de colonización y de muestras clínicas. En siete de ellos el clon obtenido en muestra de colonización fue idéntico al detectado en muestra clínica, y tan sólo en un paciente con un ingreso muy prolongado en la Unidad de Hematología los clones identificados con cuatro meses de diferencia en muestra rectal y hemocultivo fueron distintos (clones 9 y 10 respectivamente). Ambos clones fueron detectados posteriormente en dos pacientes ingresados en la misma unidad.

## 6.2. MLST

Se analizaron mediante MLST los clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 y 13 obtenidos con el sistema Diversilab™. En la figura 32 se muestran las equivalencias de las cepas analizadas con Diversilab™ con los distintos secuenciotipos de *K. pneumoniae*, se observa que los clones 2, 4 y 11 obtenidos por el sistema Diversilab™ corresponden al mismo secuenciotipo (ST11).

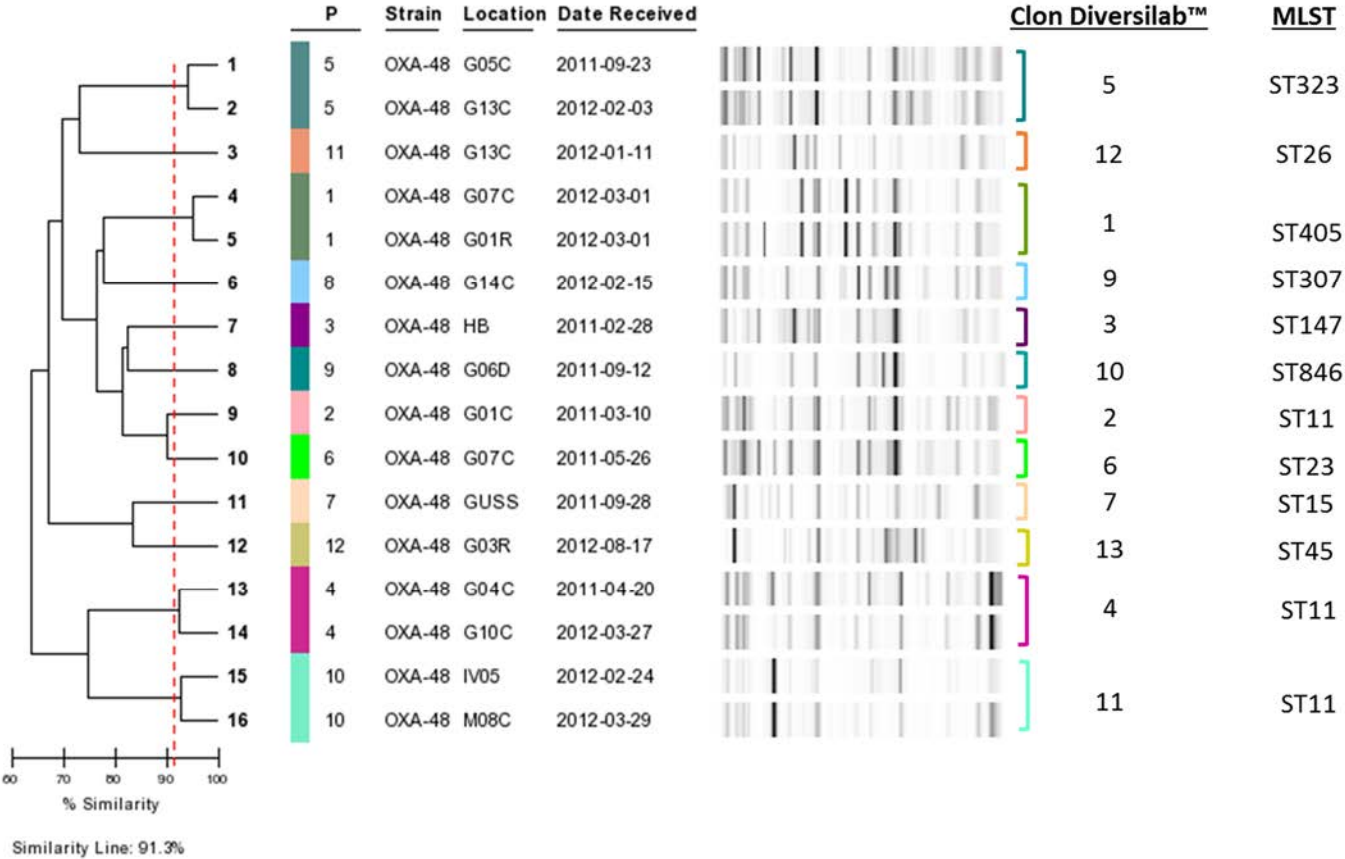


Figura 32. Dendrograma con distintos clones de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 obtenidos mediante el sistema Diversilab™ y sus correspondientes secuenciotipos.

Como se indicó en el apartado 6.1, el clon 1 (ST405) fue desplazado progresivamente por el clon 11 (ST11). En la figura 33 está representado como este desplazamiento del clon ST405 por el clon ST11 (clones 2, 4 y 11) fue paulatino en las distintas unidades de hospitalización del complejo hospitalario, produciéndose en algunas de ellas situaciones “mixtas” con co-circulación de ambas cepas.

### 6.3. Caracterización de genes de resistencia y entorno genético

Al comienzo del brote se caracterizaron mediante PCR y secuenciación los genes de resistencia a betalactámicos del clon predominante ST405 identificándose los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-76</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub> y la presencia de la secuencia de inserción IS1999 del transposón Tn1999.2 (80, 86). Se caracterizaron los genes y marcadores que confieren resistencia a quinolonas en un representante de los clones que eran mayoritarios en ese momento; clon ST405 y clon ST323, procedentes de una muestra de orina y una herida quirúrgica respectivamente, ambas cepas presentaban una disminución de la sensibilidad a quinolonas pero permanecían sensibles a ácido nalidíxico. La secuenciación de los genes *gyrA* y *parC* no mostró mutaciones de resistencia a quinolonas pero se identificaron los genes *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA* y *oqxB*. Los ensayos para determinar la localización de los genes de resistencia (80) identificaron un plásmido de 180 Kb conteniendo los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *qnrB1* y *aac(6')-Ib-cr* y un plásmido de 70 Kb con el gen *bla*<sub>OXA-48</sub>. Los genes *oqxA* y *oqxB* se encontraron localizados en el cromosoma. El gen *qnrB1* se encontró localizado cerca de la secuencia de inserción ISCR1.

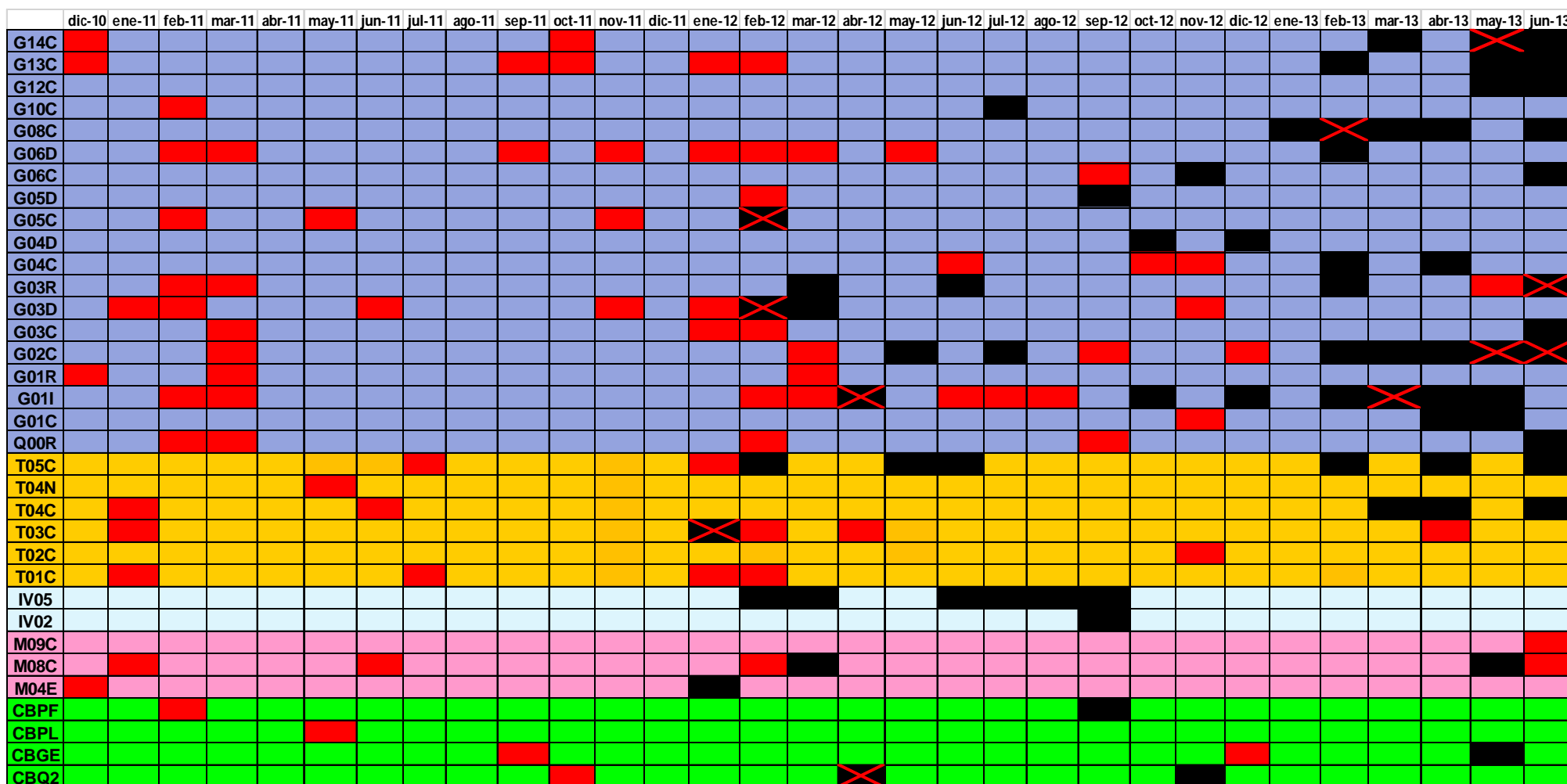


Figura 33. Distribución de los secuenciotipos mayoritarios ST405 (recuadros rojos) y ST11 (recuadros negros) en los distintos GFH a lo largo del tiempo en el Hospital General (G14C-Q00R), Hospital de Rehabilitación y Traumatología (T05C-T01C), Hospital Infantil (IV05-IV02), Hospital Maternal (M09C-M04E) y Hospital de Cantoblanco (CBPF-CBQ2). Los recuadros negros con aspas rojas representan situaciones mixtas con detección de cepas ST405 y ST11.

#### 6.4. Caracterización de genes y marcadores de resistencia mediante secuenciación de genomas completos

Mediante la secuenciación de los genomas completos de los dos clones mayoritarios ST405 (GenBank AMRH000000000) (83) y ST11 (pendiente de publicación) se identificaron los genes y marcadores de resistencia que se muestran en la tabla 24, éstos se compararon con los datos obtenidos de la secuenciación del genoma completo de una cepa ST11 productora de carbapenemasa OXA-48 aislada en el Hospital 12 de Octubre de Madrid (84). Las diferencias respecto al resistotipo en las tres cepas no son grandes, siendo las más notables la ausencia de genes *bla*<sub>TEM</sub> en la cepa ST11 aislada en el Hospital 12 de Octubre, la ausencia de genes *qnr* y de resistencia a sulfamidas y trimetoprim en la cepa ST11 aislada en el Hospital la Paz, y los diferentes perfiles genéticos de los enzimas inactivantes de aminoglucósidos. La secuenciación de genomas completos también permitió localizar al gen *bla*<sub>OXA-48</sub> dentro de un plásmido perteneciente al grupo IncL/M.



Tabla 24. Genes y marcadores de resistencia de las cepas de *K. pneumoniae* ST405 y ST11 obtenidos mediante secuenciación de genomas completos en el Hospital Universitario La Paz y en el Hospital 12 de Octubre.

		ST405 HULP*	ST11 HULP*	ST11 H120**
Fenotipo		Gen/marcador	Gen/marcador	Gen/marcador
Resistencia a betalactámicos	a	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-76</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-116</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
Resistencia a quinolonas	a	<i>qnrB66</i> , <i>oqx</i> <i>A</i> , <i>oqx</i> <i>B</i>	<i>gyrA</i> S83I, <i>parC</i> S80I, <i>oqx</i> <i>A</i> , <i>oqx</i> <i>B</i>	<i>qnrB1</i> , <i>gyrA</i> S83I, <i>parC</i> S80I
Resistencia a aminoglucósidos	a	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i>	<i>aph</i> (3')- <i>Ia</i>	<i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> , <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> , <i>aadA2</i>
Resistencia a quinolonas y aminoglucósidos	a y	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
Resistencia a cloranfenicol	a	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>	<i>catA1</i> , <i>catB2</i>
Resistencia a sulfamidas	a	<i>sul2</i>	-	<i>sul1</i>
Resistencia a trimetoprim	a	<i>dfrA14</i>	-	<i>dfrA12</i>

\*HULP: Hospital Universitario La Paz. \*\*H120: Hospital 12 de Octubre

## 7. Características de sensibilidad a antibióticos

Los resultados de sensibilidad que se muestran a continuación están referidos a los antibiogramas realizados sobre muestras clínicas y con valores de CMI conocidos y obtenidos con los métodos descritos en la sección de Material y Métodos. Al no tratarse de un informe acumulado de sensibilidad estratificado por años y con el objetivo de considerar cepas

diferentes o cepas que hayan adquirido resistencia durante el tratamiento, lo cual es frecuente en el tipo de población estudiada sometida en su mayoría a tratamientos antibióticos e ingresos prolongados, en el análisis de sensibilidad se consideraron todos los aislamientos obtenidos en un mismo paciente. De los 267 pacientes con aislamientos en muestras clínicas se realizó estudio de sensibilidad a un total de 569 aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 (Tabla 25).

Tabla 25. Distribución por especies, número de aislados y número de pacientes a los que se les realizó estudio de sensibilidad.

Especie	Aislados (n)	Pacientes (n)
<i>K. pneumoniae</i>	532	252
<i>E. coli</i>	25	19
<i>E. cloacae</i> complex	3	3
<i>S. marcescens</i>	4	2
<i>E. aerogenes</i>	2	2
<i>K. oxytoca</i>	2	1
<i>P. mirabilis</i>	1	1

## 7.1. Características de sensibilidad a antibióticos betalactámicos

### 7.1.1. *Klebsiella pneumoniae*

La mayoría de los aislados mostraron un patrón de sensibilidad compatible con la producción de BLEE, por lo que eran resistentes a ampicilina y a la mayoría de las cefalosporinas, siendo la mitad de los aislados sensibles a cefoxitina (Tabla 26). Sólo trece aislados correspondientes a nueve pacientes no eran productores de BLEE y todos

fueron sensibles a cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y aztreonam. Seis aislados fueron también sensibles a cefalosporinas de 2ª generación y cinco aislados presentaron además sensibilidad a cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. El meropenem fue el antibiótico carbapenémico con mayor proporción de aislados sensibles y el ertapenem el que menos (Tabla 26).

Tabla 26. Características de sensibilidad a cefoxitina y carbapenémicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48.

Antibiótico	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	IC 95%
Cefoxitina	448	50	45,4-54,6
Ertapenem	512	2,9	1,8-4,8
Imipenem	531	6,6	4,8-9,0
Meropenem	470	16,4	13,3-20,0

Se analizó la distribución de CMI a carbapenémicos y se calcularon los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>. Sólo se consideraron valores de CMI exactos y se descartaron todos aquellos valores que pudieran ser equívocos (p.ej: CMI  $\geq 8$  µg/ml). El meropenem fue el antibiótico que presentó el valor de CMI<sub>50</sub> más bajo y los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> más extremos: 2 y 32 µg/ml respectivamente, a diferencia del imipenem que presentó los valores más próximos y la CMI<sub>90</sub> más baja: 4 y 8 µg/ml respectivamente (Figura 34). El ertapenem fue el carbapenémico con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> más elevados: 16 y >32 µg/ml (Figura 35).

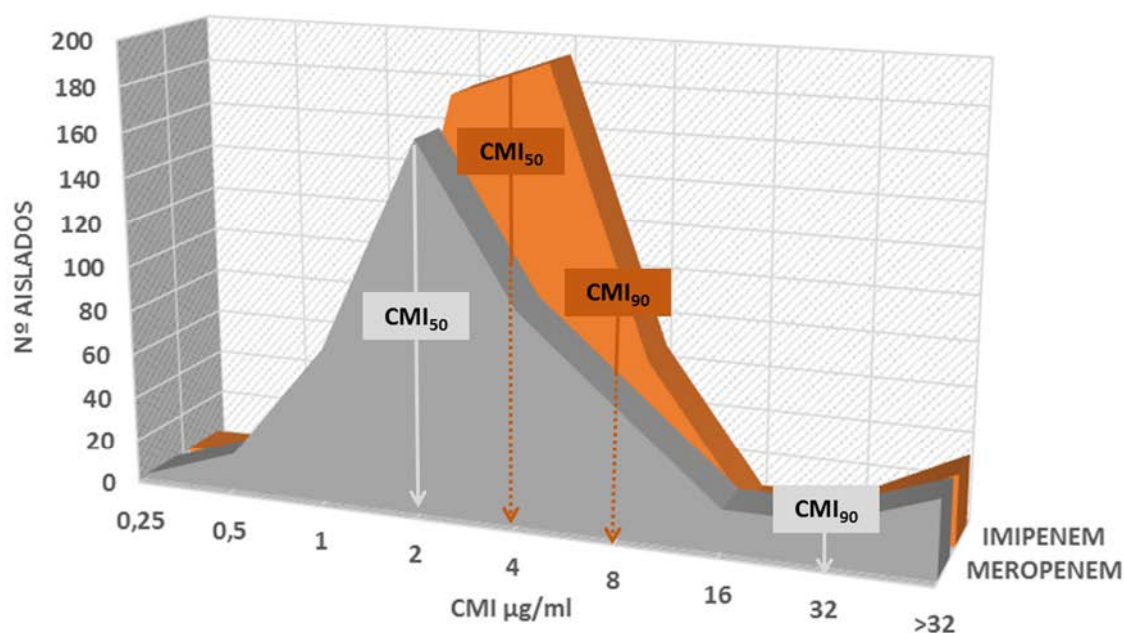


Figura 34. Curvas de distribución de CMI para imipenem y meropenem en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48. Se indica la CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> a imipenem y meropenem en 502 y 479 aislados respectivamente.

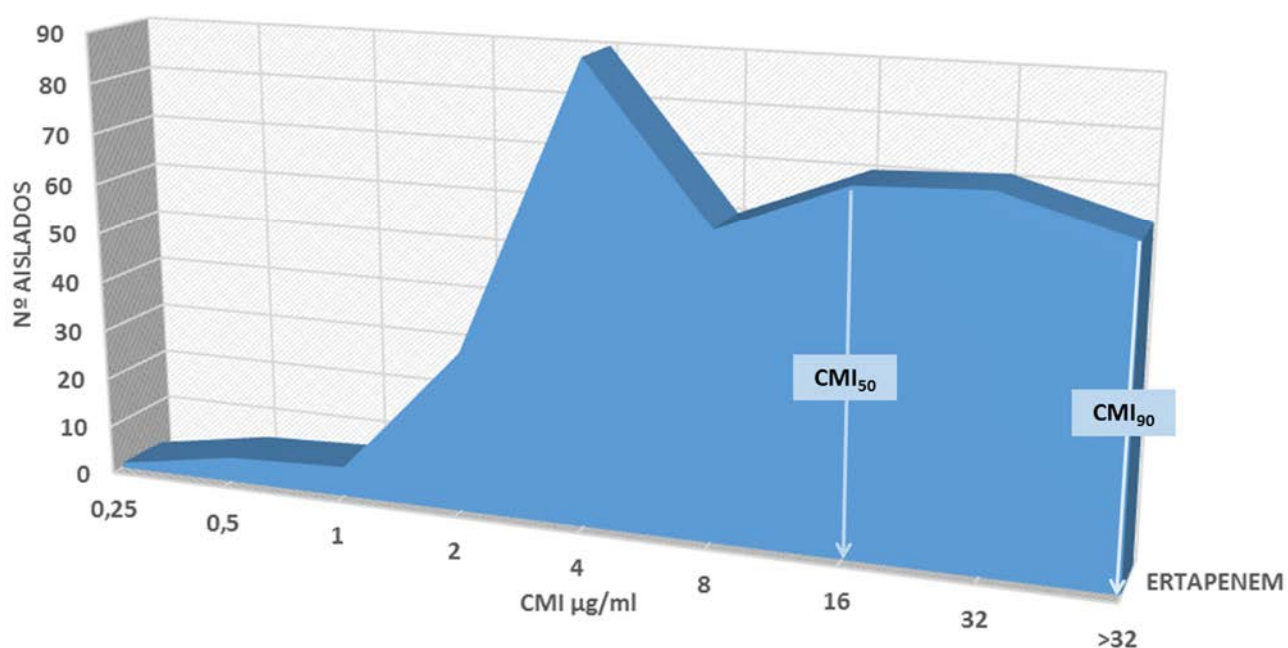


Figura 35. Curva de distribución de CMI para ertapenem en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48. Se indican los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> a ertapenem en 399 aislados clínicos.

En un estudio multicéntrico llevado a cabo por Tumbarello y cols. (89) sobre infecciones causadas por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC, concluyeron que en aquellos pacientes cuyos aislados expresaban una CMI para meropenem  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$ , la inclusión de al menos un carbapenémico en el régimen combinado de tratamiento tenía un impacto favorable en la supervivencia. Por este motivo se analizaron las cepas con valores de CMI para imipenem y meropenem  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$ , descartándose previamente las que tenían valores inexactos (p.ej: CMI  $> 1$   $\mu\text{g/ml}$ ) y obteniéndose que el 83,4% y el 81,5% de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48 tenían valores de CMI  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  para imipenem y meropenem respectivamente. Se realizó una comparación entre las cepas de los secuenciotipos ST405 y ST11 para conocer si existían diferencias significativas entre los dos clones mayoritarios con respecto a los valores de CMI  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$ , no encontrándose diferencias significativas con el meropenem pero sí con el imipenem a favor del secuenciotipo ST11 que presentó mayor proporción de cepas con CMI  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 27). Para ver la evolución temporal de las CMIs se analizó mediante un informe acumulado semestral el número de aislados con CMI  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$  a imipenem y meropenem desde el enero de 2011 a junio de 2013, no observándose incremento significativo a lo largo del tiempo.

Tabla 27. Cepas clínicas de *K. pneumoniae* ST405 y ST11 con valores de CMI  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  frente a imipenem y meropenem.

Antibiótico	ST405		ST11		Valor de p
	Aislamientos (n)	CMI $\leq 8$ $\mu\text{g/ml}$ (%)	Aislamientos (n)	CMI $\leq 8$ $\mu\text{g/ml}$ (%)	
Imipenem	203	77,8	170	90,6	0,0009
Meropenem	175	77,7	159	84,3	0,1

Debido a que el 50% de los aislados no eran sensibles a cefoxitina y conociéndose que la resistencia a este fármaco es un marcador de permeabilidad de la célula bacteriana a los antibióticos (90), se analizó si existían diferencias significativas de sensibilidad a los carbapenémicos entre los aislados que mostraban resistencia a cefoxitina y los que no. Los resultados demostraron que existían diferencias significativas de sensibilidad entre los aislados sensibles y los no sensibles a cefoxitina para ertapenem, imipenem y meropenem (Tabla 28), siendo la diferencia entre las proporciones de aislados sensibles mayor para el meropenem.

Tabla 28. Sensibilidad a los carbapenémicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48 sensibles (S) y no sensibles (I/R) a cefoxitina.

Antibiótico	Cefoxitina S		Cefoxitina I/R		Valor de p
	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	
Ertapenem	212	4,2	169	0	0,006
Imipenem	224	8,9	223	4	0,035
Meropenem	204	23,5	203	8,9	<0,0001

S: Sensible, I: Sensibilidad intermedia y R: Resistente.

Finalmente se comparó si existían diferencias de sensibilidad a la cefoxitina y a los carbapenémicos entre los dos secuenciotipos de *K. pneumoniae* mayoritarios (ST405 y ST11), encontrándose diferencias estadísticamente significativas para la cefoxitina y el ertapenem (Tabla 29) para los que el secuenciotipo ST11 resultó ser más resistente.

Tabla 29. Sensibilidad a cefoxitina y carbapenémicos en cepas clínicas ST405 y ST11 de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48.

Antibiótico	ST405		ST11		Valor de p
	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	
Cefoxitina	169	58	162	33,9	<0,0001
Ertapenem	187	3,7	171	0	0,01
Imipenem	204	6,4	170	6,2	1
Meropenem	176	19,3	159	14,5	0,2

### 7.1.2. *Escherichia coli*

A diferencia de lo observado en *K. pneumoniae*, la mayoría de los aislados de *E. coli* no eran productores de BLEE (72% de los aislados no producían BLEE; IC95%: 50,6-87,9). Sin embargo, al igual que lo observado en *K. pneumoniae*, también presentaban una mayor resistencia a ertapenem (sólo un aislado fue sensible; IC95%: 0,1-21,5) que a imipenem (12% sensibles; IC95%: 2,5-31,2) y meropenem (56% sensibles; IC95%: 36,6-77,9). Debido al bajo número de aislados de *E. coli* no se realizó estudio de distribución de CMI a los carbapenémicos ni se calcularon los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>.

### 7.1.3. Características de sensibilidad en otras especies

Ningún aislado de las otras enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 (*E. cloacae* complex, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* y *P. mirabilis*) fue sensible a ertapenem e imipenem mientras que todos los aislados de *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* y un aislado

de *E. cloacae sensu stricto* fueron sensibles a meropenem. Fenotípicamente se observó la presencia de BLEE asociada en: *E. aerogenes*, tres aislados de un mismo paciente de *S. marcescens* y en un aislado del mismo paciente de *E. cloacae sensu stricto*.

## 7.2. Características de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos

### 7.2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Los antibióticos frente a los cuales los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48 presentaron una mayor sensibilidad fueron por este orden: amikacina con un 96,4% de aislados sensibles, colistina (82%), tigeciclina (70,4%), minociclina (69,9%), fosfomicina (48,3%) y nitrofurantoína (37,2%) (Tabla 30).

Tabla 30. Características de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48.

Antibiótico	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	IC 95%
Tigeciclina	257	70,4	64,6-75,7
Colistina	506	82	78,4-85,1
Amikacina	522	96,4	94,4-97,7
Gentamicina	532	17,7	14,7-21,1
Tobramicina	511	9,4	7,2-12,2
Minociclina	113	69,9	60,9-77,6
Ácido nalidíxico	531	37,9	33,8-42,0
Ciprofloxacino	532	8,3	6,2-10,9
Norfloxacino	205	12,2	8,4-17,4
Cotrimoxazol	472	10,8	8,3-13,9
Fosfomicina	462	48,3	43,7-52,8
Nitrofurantoína	441	37,2	32,8-41,9



Los antibióticos no betalactámicos con una mayor tasa de resistencia fueron (por orden): ciprofloxacino, tobramicina y cotrimoxazol.

Globalmente los aislados de *K. pneumoniae* presentaron mayor sensibilidad a ácido nalidíxico que a ciprofloxacino o norfloxacino, lo que pone de manifiesto la presencia de un mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos, como ya se demostró con métodos moleculares en las cepas de los secuenciotipos ST405 y ST323 (apartados 6.3 y 6.4). La elevada tasa de resistencia a tobramicina y gentamicina, pero manteniendo la sensibilidad a amikacina, podría estar mediado por distintas enzimas acetiltransferasas del grupo AAC(3) o por AAC(6')-II; o la fosfotransferasa APH(2'')-I; o la nucleotidiltransferasa ANT(2'')-I. El menor número de aislados ensayados frente a minociclina y tigeciclina se debe a que estos antibióticos no se utilizan en aislados procedentes de muestras de orina y tampoco de hemocultivo en el caso de la minociclina, dejándose éste último de incluir en los paneles de antibióticos utilizados a partir de mayo de 2012. De manera similar, con el norfloxacino sólo se realizaron pruebas de sensibilidad frente a aislados procedentes de muestras de origen urinario. Puntualmente se realizaron antibiogramas con antibióticos fuera de los protocolos establecidos cuando el perfil de sensibilidad del aislado y la situación clínica del paciente lo exigía.

Del mismo modo que se procedió en el apartado 7.7.1 con los antibióticos betalactámicos, se analizó como afectaba el perfil de sensibilidad a cefoxitina cuando se comparaba la sensibilidad frente a los antibióticos no betalactámicos. De esta manera se pudo comprobar que los aislados resistentes o con sensibilidad intermedia a cefoxitina eran también

de manera significativa menos sensibles a tigeciclina, minociclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, fosfomicina y nitrofurantoína (Tabla 31).

Tabla 31. Sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa OXA-48 sensibles (S) y no sensibles (I/R) a cefoxitina

Antibiótico	Cefoxitina S		Cefoxitina I/R		Valor de p
	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	
Tigeciclina	103	93,2%	152	55,3%	<0,0001
Colistina	211	84,8%	211	77,2%	0,046
Gentamicina	223	19,3%	224	19,6%	0,9
Tobramicina	218	11,5%	208	7,2%	0,1
Amikacina	216	98,1%	222	94,1%	0,03
Minociclina	71	84,5%	42	45,2%	<0,0001
Ácido nalidíxico	223	55,6%	224	16,1%	<0,0001
Norfloxacino	68	11,8%	54	3,7%	0,1
Ciprofloxacino	224	12,0%	224	3,6%	0,0008
Cotrimoxazol	196	11,7%	192	12,5%	0,8
Fosfomicina	195	60,0%	183	28,4%	<0,0001
Nitrofurantoína	191	55,5%	166	14,5%	<0,0001

S: Sensible, I: Sensibilidad intermedia y R: Resistente.

Cuando se comparó si existían diferencias de sensibilidad entre los secuenciotipos ST405 y ST11 frente a los antibióticos no betalactámicos (Tabla 32), se encontraron diferencias significativas a favor de una mayor resistencia en las cepas ST405 frente a colistina, gentamicina, tobramicina y cotrimoxazol; y mayor resistencia de las cepas ST11 frente a ácido nalidíxico, norfloxacino, ciprofloxacino, fosfomicina y nitrofurantoína. La

minociclina no se incluyó en este análisis por ser menor de 30 el número de cepas ST11 probadas frente a este antibiótico.

Tabla 32. Sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en cepas clínicas ST405 y ST11 de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48.

Antibiótico	ST405		ST11		Valor de p
	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	
Tigeciclina	100	70	94	69,1	0,9
Colistina	188	89,4	165	80	0,01
Gentamicina	204	4,4	170	31,8	<0,0001
Tobramicina	199	4	161	9,9	0,02
Amikacina	201	96,5	157	94	0,2
Ácido nalidíxico	203	69	171	4,2	<0,0001
Norfloxacino	56	23,2	66	0	<0,0001
Ciprofloxacino	204	10,3	171	1,7	0,0007
Cotrimoxazol	170	3,5	157	17,8	<0,0001
Fosfomicina	172	77,9	145	13,8	<0,0001
Nitrofurantoína	160	58,1	145	6,9	<0,0001

### 7.2.2. *Escherichia coli*

El perfil de sensibilidad de los aislados de *E. coli* se encuentra recogido en la tabla 33, a pesar del escaso número de aislados, a todos los que se les realizó antibiograma frente a tigeciclina y fosfomicina fueron sensibles y la totalidad de los aislados recogidos en el estudio fueron sensibles a amikacina.

Tabla 33. Características de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en aislados clínicos de *E. coli* productores de carbapenemasa OXA-48.

Antibiótico	Aislamientos (n)	Sensibles (%)	IC 95%
Tigeciclina	13	100	75,3-100
Colistina	22	81,8	59,7-94,8
Amikacina	25	100	86,3-100
Gentamicina	25	80	59,3-93,1
Tobramicina	24	75	53,3-90,2
Ácido nalidixico	25	20	6,8-40,7
Ciprofloxacino	25	40	21,1-61,3
Cotrimoxazol	21	42,9	21,8-65,9
Fosfomicina	20	100	83,1-100
Nitrofurantoína	19	94,7	74-99,9

### 7.2.3. Características de sensibilidad en otras especies

La amikacina fue el único antibiótico al que fueron sensibles todos los aislados de este grupo, siendo la sensibilidad a gentamicina y tobramicina muy variable. Todos los aislados de *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *S. marcescens* fueron también sensibles al cotrimoxazol y ciprofloxacino.

### 7.3. Enterobacterias panresistentes y extremadamente resistentes

Durante el periodo de estudio se aisló una cepa de *K. pneumoniae* panresistente según la definición de Magiorakos y cols. (91). La cepa se obtuvo en una muestra de orina y presentaba una sensibilidad intermedia a tigeciclina (4 µg/ml) y amikacina (32 µg/ml) con CMI a carbapenémicos > 8 µg/ml.

A la hora de definir los aislados extremadamente resistentes también se tuvo en cuenta el documento de Maiorakos y cols. pero no se consideró el ertapenem (aproximadamente el 97% de los aislados eran resistentes) y se interpretaron como sensibles a imipenem o meropenem aquellos aislados con una CMI por debajo de 8 µg/ml, por ser a partir de esa CMI potencialmente tratables con estos antibióticos. Después de aplicar esta restricción se obtuvieron 44 aislados en 30 pacientes con un fenotipo de resistencia a antibióticos extremadamente resistente, la mayoría eran aislados de *K. pneumoniae* a excepción de un aislado de *E. aerogenes*. Las muestras donde más frecuentemente fueron obtenidas estas cepas con elevada resistencia fueron orina (23 aislados en 15 pacientes) y hemocultivo (11 aislados en 8 pacientes). La mayoría conservaban la sensibilidad a amikacina, a excepción de dos aislados, uno sensible a colistina y el otro a fosfomicina. El 50% y 39,4% de las cepas extremadamente resistentes tenía CMIs a imipenem y meropenem < 8 µg/ml respectivamente.

## Discusión



Los carbapenémicos constituyen uno de los grupos de antibióticos disponibles más potentes que existen y son el tratamiento de elección para el tratamiento de infecciones graves producidas por enterobacterias productoras de BLEE, además de infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes. Su amplia utilización durante los años 80 y 90 para el tratamiento de infecciones producidas por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, han contribuido, junto con otros factores, al rápido desarrollo de resistencia a carbapenémicos (92). En 2001 se describió la primera enterobacteria productora de carbapenemasa del tipo KPC-1 (12), desde entonces se han descrito casos esporádicos y brotes de una gran variedad de carbapenemasas en especies de enterobacterias con una amplia diseminación a nivel mundial (20). En España los primeros aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasas se describieron en 2005 (93) y en 2009 se publicó el primer estudio multicéntrico a nivel nacional en el que sólo se detectaron carbapenemasas tipo IMP y VIM y cuya prevalencia era de un 0,04% (94). Sin embargo, un nuevo trabajo de ámbito nacional publicado en 2012 muestra un incremento considerable en la prevalencia y un cambio en el perfil de carbapenemasas detectadas con predominio de OXA-48, KPC y VIM (95). La epidemiología de las infecciones producidas por enterobacterias productoras de carbapenemasa es compleja y varía dependiendo de la especie bacteriana, clon y tipo de carbapenemasa. El brote por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 ocurrido en el Hospital Universitario La Paz es prácticamente simultáneo a otros brotes descritos en otros países de Europa (96) y a brotes acontecidos en España (97) y en la Comunidad de Madrid (98). Estos brotes tienen características comunes pero también particularidades especiales con



respecto a otros brotes por bacterias multirresistentes, entre éstas habría que destacar: dificultad en la detección, gran facilidad en la dispersión, diseminación policlonal e interespecies y características propias en el perfil de resistencia a antibióticos. En esta Tesis se estudian y analizan estos aspectos comunes y particulares de las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el contexto de un brote hospitalario.

## **1. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 e inicio del brote**

Los primeros casos del brote descrito en esta Tesis Doctoral se detectaron en diciembre de 2010, sin embargo un análisis retrospectivo identificó varios casos previos a esta fecha durante el año 2010. Este inicio inusual, con una diseminación desde el comienzo del brote que podríamos considerar de explosiva, se debe probablemente entre otros factores, a las dificultades asociadas a la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas.

Los antibióticos carbapenémicos son frecuentemente la opción terapéutica más efectiva disponible en el tratamiento de infecciones producidas por enterobacterias multirresistentes (99), esta circunstancia unida a la rápida y prolífica expansión de las enterobacterias productoras de carbapenemasa a nivel mundial (20), ha convertido su detección en una prioridad asistencial desde el punto de vista clínico, epidemiológico y de aplicación de medidas de control de la infección en los procedimientos relacionados con la asistencia sanitaria. Sin embargo, en muchas ocasiones la detección de este mecanismo de resistencia en un determinado aislado bacteriano constituye un auténtico reto. Las dificultades vienen determinadas por una serie de factores que podríamos clasificar como factores biológicos: a) distintos niveles de expresión del enzima; b) diferente afinidad del enzima frente a los sustratos o c) la presencia de otros mecanismos de resistencia concomitantes a antibióticos betalactámicos; y factores técnicos: a) los sistemas automáticos no siempre permiten detectar los puntos de corte propuestos por los comités científicos; b) los métodos fenotípicos más asequibles son poco sensibles o inespecíficos y c) los métodos moleculares, más sensibles y específicos, no están al alcance

de todos los laboratorios. En este sentido las enterobacterias productoras de carbapenemasa de tipo OXA-48 poseen una serie de características fenotípicas que dificultan su detección, y pueden pasar inadvertidas si no se tienen la experiencia y los medios técnicos apropiados. El espectro de fenotipos incluye aislados que son sensibles a cefalosporinas de amplio espectro y a carbapenémicos, otros sensibles a cefalosporinas de amplio espectro pero resistentes a carbapenémicos, y por último, aislados resistentes a cefalosporinas de amplio espectro por la presencia de otros mecanismos de resistencia a betalactámicos (BLEE o AmpC) y sensibilidad variable a carbapenémicos (100). En el brote descrito en esta Tesis Doctoral, los valores de CMI a carbapenémicos obtenidos en los tres casos detectados retrospectivamente se encontraban en el rango de sensibilidad según los puntos de corte propuestos por el CLSI hasta junio de 2010 (101), presentando unos valores de CMI para ertapenem  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ , imipenem  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  y meropenem  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , y sólo un aislado tenía un valor de CMI para meropenem en el rango de sensibilidad intermedia (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Por este motivo, es posible que los puntos de corte utilizados hasta ese momento hayan conducido a una infraestimación de los casos potenciales detectados a partir de muestras clínicas antes del comienzo del brote. En junio de 2010 el CLSI introduce una modificación considerable en los puntos de corte (101), cuyo objetivo era detectar sin necesidad de la realización de pruebas adicionales poco específicas (p.ej: THM) todas las enterobacterias potencialmente productoras de carbapenemasas; considerando sensibles aquellos aislados cuyos valores de CMI a imipenem y meropenem sean  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  y a ertapenem  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$ . En este sentido, la disminución de los puntos de corte añadió una dificultad técnica en la realización de antibiogramas con sistemas automáticos, el sistema Wider sólo permite

detectar valores de CMI de 2 µg/ml frente a ertapenem y meropenem y de 1 µg/ml frente a imipenem, además el panel para gramnegativos en muestras de orina sólo detecta valores de CMI de 2 µg/ml frente a ertapenem e imipenem. El sistema Vitek2, que en el presente trabajo sólo se utilizó en aislados procedentes de hemocultivos, posee un rango dinámico de concentraciones algo más amplio, pudiendo detectar CMI de 0,25 µg/ml frente a imipenem pero siendo todavía insuficiente en el caso del ertapenem (valor de CMI mínimo detectable 0,5 µg/ml). Sin embargo, los 4 casos que iniciaron el brote en diciembre de 2010 pudieron ser detectados sin dificultad, debido a que los valores de CMI a los carbapenémicos estaban en su mayoría en el rango de resistencia frente a ertapenem e imipenem (CMI >4 µg/ml) y sensibilidad disminuida frente a meropenem (2 µg/ml); alcanzándose en la primera muestra en dos de los casos valores de CMI muy elevados (>32 µg/ml) para ertapenem. Por otro lado, antes del comienzo del brote los estudios de vigilancia epidemiológica no se realizaban en el Servicio de Microbiología, y no disponemos de los resultados, ni conocemos la metodología utilizada. Es probable que todas estas circunstancias hayan contribuido a la rápida diseminación y, sobre todo, a la imposibilidad de haber podido realizar una trazabilidad adecuada en el inicio del brote, no pudiéndose descartar tampoco que hubiera pacientes infectados o colonizados por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 incluso antes de los pacientes detectados retrospectivamente. Algunos brotes nosocomiales descritos en países de Europa, como Francia (102-104) y España (97), se asociaron al ingreso de un caso índice procedente de países endémicos como Turquía o Marruecos. En el presente estudio ninguno de los primeros pacientes, ni tampoco los detectados de manera retrospectiva, reflejaban en los registros del hospital

el haber estado ingresados o proceder de los países considerados endémicos hasta ese momento.

## **2. Diseminación del brote**

En esta Tesis Doctoral se ha presentado el que probablemente sea el mayor brote nosocomial producido por enterobacterias portadoras del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> descrito hasta ahora. El escenario epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasa del que partíamos en el complejo hospitalario hasta el momento del inicio del brote comprendía: detección desde 2005 de casos esporádicos de enterobacterias productoras de carbapenemasa tipo VIM-1 en pacientes fundamentalmente pediátricos (88) y un pequeño brote de *C. freundii* productor de carbapenemasa tipo KPC-2 ocurrido en 2009 y principios de 2010 en unidades de hospitalización de adultos pero sin aparente relación entre sí, aunque las cepas fueron clonales (105). Sin embargo, el brote por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 tuvo un comienzo abrupto y una distribución muy dispersa; patrones similares, de difícil control aunque con menor números de casos, se han publicado en otros hospitales de Holanda (106), Francia (107) y España (98). El brote mostró un patrón multifocal, en la mayoría de las ocasiones en forma de pequeños brotes que se van sucediendo temporalmente en distintas unidades sin relación evidente y sin, aparentemente, ningún elemento o fómite conocido que pudiera estar implicado en la transmisión (endoscopios, equipos de rayos portátiles, alimentos, etc). Dentro de cada brote sí se observó la importancia de la cercanía en espacio y tiempo con pacientes colonizados o infectados en la aparición de nuevos casos. Este hecho resalta la trascendencia del cumplimiento de las medidas de control de la infección en el desarrollo de

las actividades propias de los cuidados sanitarios y por otro la importancia que tienen los pacientes infectados y colonizados que actúan como reservorios. Durante el periodo recogido en este estudio no se buscaron reservorios ambientales, aunque posteriormente sí se pudieron identificar focos de origen ambiental, fundamentalmente reservorios húmedos (sifones de lavabos) y poco accesibles para los que es difícil determinar el papel que juegan en la génesis de nuevos casos.

### **3. Características clínico-epidemiológicas y microbiológicas**

Aunque la infección más frecuente fue la del tracto urinario seguida de las infecciones quirúrgicas, debe destacarse la bacteriemia en una proporción cercana al 20%, porcentaje que se eleva a un 34,8% si consideran sólo los pacientes con aislamientos en muestras clínicas. En las dos series pertenecientes a la cohorte de pacientes del Hospital La Paz en las que se analizaron las características epidemiológicas, microbiológicas y clínicas en pacientes con enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en muestras clínicas (86) y en pacientes con bacteriemia (87) se observó una mortalidad cruda durante el ingreso del 65%, y en torno al 50% a 30 días. La mortalidad atribuible en el estudio de las bacteriemias fue de un 57,7%, pero señalarse que la mortalidad achacable a un solo evento clínico es muy difícil de establecer debido a la elevada comorbilidad que presentaban estos pacientes. El carácter retrospectivo de ambos estudios no permite establecer factores de riesgo, aunque entre las características comunes que se encontraron en ambos estudios habría que destacar: haber recibido tratamientos antibióticos previos, haber sido sometido a intervenciones quirúrgicas, presencia de dispositivos (sondas urinarias y catéteres centrales), presencia de comorbilidades, siendo los tumores las

más frecuentes en los pacientes con bacteriemia, y estancias prolongadas como se puede deducir de los registros de tiempo transcurrido desde el ingreso hasta la aparición de la infección.

Los estudios de colonización fueron los que detectaron más pacientes, y la muestra de vigilancia la muestra incidente más frecuente. Sin embargo, debe señalarse que los estudios de colonización no fueron constantes y los cribados en algunas plantas de hospitalización se efectuaron en función de la evolución del brote. Por esta razón, es posible que el comienzo del brote haya sido anterior a los primeros casos diagnosticados, y que hubiera un reservorio de pacientes colonizados no detectados en zonas del hospital en las que rutinariamente no se realizan estudios de colonización. Este hecho indica que la población colonizada es mucho mayor que la población que posteriormente desarrolla la infección. Además, esta población trasciende a todos los pacientes que han estado alguna vez ingresados o que han tenido contacto con el hospital, hecho que justifica la realización de estudios de colonización en función de la evolución del brote para poder controlar el reservorio más importante que son los propios pacientes.

En este sentido cabe destacar que en más del 20% de los pacientes con aislamientos en muestras clínicas las infecciones fueron de inicio comunitario, siendo la orina la muestra con mayor frecuencia obtenida en estos pacientes. Además, el 9,7% del total de bacteriemias por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 tuvieron un inicio comunitario. Todas estas infecciones han estado asociadas a ingresos recientes y/o a cuidados sanitarios no pudiéndose evidenciar ningún caso de origen estrictamente comunitario, aunque algunos autores han documentado la transmisión entre convivientes (108) y la detección en

animales de compañía (109), medio ambiente extrahospitalario (110) e individuos sanos (111). En un trabajo en revisión realizado en El Hospital La Paz en el que se analizaron todas las infecciones de inicio comunitario por enterobacterias productoras de carbapenemasas el 57% estuvieron asociadas a los cuidados sanitarios según los criterios de Friedman (112) porcentaje que llega a un 87% cuando se ampliaba el tiempo desde los últimos cuidados sanitarios a 12 meses.

A lo largo del brote se identificaron 9 especies distintas de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 y la detección concomitante de varias especies en un mismo paciente ha sido un fenómeno observado con cierta frecuencia, llegándose a detectar distintas especies en una misma muestra o incluso distintos fenotipos morfológicos y de sensibilidad de una misma especie en la misma muestra. Esta enorme diversidad apoya la gran capacidad de movilización interespecie del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> y su capacidad de diseminación intra-paciente (113).

La mayor proporción de aislamientos de *E. coli* se obtuvieron en muestras clínicas, esta diferencia se debe probablemente a que el medio de cultivo utilizado para los estudios de colonización está suplementado con 4 mg/L de cefotaxima y la mayor parte (72%) de los aislados de *E. coli* en muestras clínicas tenían un fenotipo no productor de BLEE, habiendo posiblemente pacientes colonizados por *E. coli* OXA-48 sin BLEE que no se han detectado. La bacteria *E. coli* es el patógeno que con mayor frecuencia produce infección del tracto urinario a nivel comunitario y nosocomial (114) y en la cohorte de pacientes aquí descrita, ha sido la orina la muestra clínica en la que con mayor frecuencia se han aislado enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48; sin embargo, los aislados de *E. coli* obtenidos en muestras clínicas procedían en su mayor parte de muestras quirúrgicas



seguidas de los hemocultivos y sólo en 4 de los 19 pacientes con infección por *E. coli* el aislado procedía de muestras de orina.

La co-producción de distintas carbapenemasas en una misma cepa se ha descrito en varias ocasiones (109, 115-117) y habitualmente se ha asociado a situaciones de endemia o a pacientes procedentes de zonas endémicas. En febrero de 2012 se detectaron en el Hospital La Paz tres casos de *K. pneumoniae* co-productoras de carbapenemasas OXA-48 y VIM, en mayo de 2013 aparecieron cuatro pacientes colonizados por cepas de *C. freundii* también co-productoras de carbapenemasas OXA-48 y VIM en dos de las mismas plantas en las que anteriormente se habían registrado los casos de *K. pneumoniae*. Este es un ejemplo de aparición de casos muy separados en el tiempo que puede estar indicando la existencia de un reservorio ambiental oculto, en el que se haya favorecido la transferencia de genes entre distintas especies. En este sentido, los reservorios ambientales húmedos, fundamentalmente sifones de lavabos y duchas, han sido señalados por algunos autores como posibles reservorios de enterobacterias productoras de carbapenemasa (118-120), que pueden perpetuar la aparición de casos a pesar de que las medidas de control de la infección se estén cumpliendo. Durante el brote se recogieron muestras ambientales que corroboran lo publicado pero cuyos datos no se han incluido en esta Tesis.

#### **4. Epidemiología molecular**

La tipificación molecular mediante Diversilab™ primero, y complementado con MLST después, mostró que el brote tiene una estructura policlonal, con hasta 14 clones diferenciados utilizando la técnica de rep-PCR automatizada. No obstante, en términos cuantitativos la

diversidad es limitada, la inmensa mayoría de los aislados pertenece a dos clones, existiendo un clon con frecuencia intermedia, y el resto son esporádicos o muy limitados. El plásmido que contiene el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> es prácticamente idéntico al plásmido IncL/M caracterizado previamente (121). Este plásmido posee una elevada frecuencia de conjugación con gran capacidad de transferencia intra e interpecífica y por tanto un elevado potencial epidémico.

La diversidad clonal, determinada por el sistema Diversilab™, fue similar entre aislados procedentes de muestras clínicas y muestras de colonización, aunque resultó algo mayor en los aislados procedentes de muestras clínicas. Esta pequeña diferencia, posiblemente casual, podría venir determinada por la forma de selección de las cepas en el medio de cultivo utilizado para las muestras de colonización al estar suplementado con 4mg/L de cefotaxima. Sin embargo, entre los clones sólo presentes en las muestras clínicas, únicamente la cepa perteneciente al clon 13 mostró sensibilidad a cefotaxima al no ser productora de BLEE. El predominio del clon 5 en aislados procedentes de pacientes quirúrgicos probablemente haya venido determinado por la existencia de circuitos asistenciales propios. Un brote por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 en la que se detectaron dos cepas epidémicas distintas en los pacientes a cargo de los servicios médicos y de los quirúrgicos ha sido descrito por Wrenn y cols. en un hospital de Dublín (122).

La obtención de clones bien diferenciados por el sistema Diversilab™ que correspondieron a un mismo secuenciotipo, pone de manifiesto el mayor poder de discriminación del sistema Diversilab™ frente al tipado por MLST en las cepas de *K. pneumoniae* analizadas. Estas diferencias son debidas a las características inherentes de cada una de las técnicas, siendo

el MLST una técnica no recomendada en la investigación de brotes hospitalarios y epidemiología local, si bien es muy útil como marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo por no discriminar las variaciones que puedan surgir geográfica o temporalmente (123, 124).

En un brote hospitalario ocurrido en Holanda, los autores sugieren que el comienzo del brote se debió a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE CTX-M-15 que adquirió el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> (106). En el brote aquí descrito no podemos descartar la adquisición del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE pre-existentes en el hospital, pero esta hipótesis es poco probable debido a que ST405 era un secuenciotipo infrecuente hasta la aparición de cepas productoras de carbapenemasa OXA-48 no sólo en España, también en Francia y Bélgica (125). Sí parece probable que el secuenciotipo ST11, que acabó desplazando al ST405 y se convirtió en el clon más frecuente a lo largo del brote, fuese un clon pre-existente en éste o algún otro hospital, ya que se trata de un clon de amplia distribución descrito en numerosos hospitales previamente, y que ha estado también implicado en la diseminación de carbapenemasas NDM-1, KPC-2 y VIM (126), además de en la dispersión de OXA-48 en Argentina (127) y países de la cuenca Mediterránea como Grecia (128) , Turquía (127) y España (125, 129, 130). El desplazamiento del clon ST405 por el clon ST11 pone de manifiesto su mayor adaptación al medio hospitalario, habiéndose descrito este secuenciotipo como un clon de elevado riesgo (*high-risk clone*) por su elevada capacidad de diseminación y la versatilidad de su acervo de genes de resistencia (131). El tercer clon más frecuente correspondió al ST323 que se correlacionaba con el clon 5 en el análisis realizado mediante Diversilab™ y que hasta el momento sólo se ha

descrito en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE en Túnez (132), República Checa (133) y cepas productoras de KPC-2 o con co-producción de KPC-2 y VIM en Grecia (134). Al igual que el anterior secuenciotipo, el ST307 no se había descrito previamente en cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 pero sí en cepas productoras de KPC-2 en Italia (135) y Estados Unidos (136) donde está emergiendo y parece estar sustituyendo en parte al clon productor de KPC-2 por excelencia ST258. Los secuenciotipos como el ST846 y ST147 encontrados en el brote fueron esporádicos, aunque este último ya había sido descrito en Francia (137), en combatientes de origen libio (138) y en Estados Unidos (127) asociado a cepas productoras de OXA-48. El secuenciotipo ST15 productor de OXA-48 está descrito como uno de los más prevalentes en España (125); sin embargo, la única cepa perteneciente a este clon durante el brote se aisló en una orina recogida en el momento del ingreso en un paciente de 17 años que anteriormente había estado ingresado en Melilla. Por último, destacar que el clon ST23 no se había descrito previamente como productor de OXA-48, pero se ha asociado a una cepa de *K. pneumoniae* hipervirulenta productora de abscesos hepáticos, bacteriemias e infecciones metastásicas, fundamentalmente de adquisición comunitaria y en países como Taiwan (139), China (140, 141) y Corea del Sur (142, 143), con algunos casos descritos fuera del sudeste asiático (144-146). En la cohorte de este hospital se detectaron dos pacientes, sin aparente vínculo entre sí, con tres aislamientos en muestras clínicas de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 pero no productora de BLEE y con secuenciotipo ST23. El primer caso fue un paciente trasladado del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo que falleció con shock séptico de origen respiratorio tras el aislamiento en muestras de orina y aspirado traqueal, el mal estado

general del paciente debido a la gravedad de su enfermedad de base, relacionada con un síndrome paraneoplásico neurológico con afectación pulmonar, hace muy difícil vincular la hipotética virulencia de la cepa con el desenlace final. En el segundo caso podría existir un vínculo epidemiológico por tratarse de una paciente procedente del sudeste asiático (zona rural de Filipinas) con antecedentes de asma bronquial y EPOC, ingresada por disnea de mínimos esfuerzos y cuyo aislado se obtuvo en una muestra de esputo. Estos pacientes no coincidieron en espacio y tiempo, existiendo una diferencia de casi un año entre los aislados de uno y otro, por lo que parece improbable que se hubiese producido una transmisión entre ambos dentro del hospital.

La asociación del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> con un gen de la familia *qnrB* en *K. pneumoniae* se ha descrito recientemente es una cepa aislada en una muestra de orina en un hospital de Marruecos (147). En España de manera similar a las cepas ST405 y ST323 de *K. pneumoniae* pertenecientes a este brote, se han descrito cepas de *E. cloacae* conteniendo los genes *bla*<sub>OXA-48</sub> en un plásmido de 65 Kb y los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr* en otro plásmido de 150 Kb (148).

El resistotipo obtenido mediante secuenciación del genoma completo estaba en concordancia con los resultados fenotípicos obtenidos con el antibiograma; sin embargo, la cepa ST11 secuenciada en el Hospital La Paz no presentaba el gen *qnrB*, a diferencia de una cepa del mismo secuenciotipo aislada en otro hospital de la Comunidad de Madrid (84).

## 5. Características de resistencia a antibióticos e implicaciones terapéuticas

Diversos estudios observacionales y revisiones han concluido que la inclusión de al menos un antibiótico carbapenémico en el tratamiento combinado de infecciones producidas por bacterias productoras de carbapenemasas, se asocia a una disminución de la mortalidad (149, 150). En algunos de estos estudios, la efectividad del régimen de tratamiento en el que se incluía un carbapenémico parecía estar restringida a cepas con CMI a imipenem o meropenem  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ . Las características de toxicidad del imipenem, han hecho que el meropenem sea el antibiótico más utilizado, aumentando la dosis a 2 g cada 8 horas en perfusión extendida o 6 g al día en infusión continua para mantener más del 40% de  $T > \text{CMI}$  y conseguir efecto bactericida en las cepas con CMI más elevadas. En este estudio, el meropenem fue el antibiótico carbapenémico al que fueron sensibles un mayor porcentaje de cepas de *K. pneumoniae*; pese a ello, el imipenem fue el que presentó una  $\text{CMI}_{90}$  más baja y de manera global un mayor número de cepas con CMI  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  comparado con el meropenem, esta proporción se hizo más evidente cuando se compararon meropenem e imipenem frente a los secuenciotipos mayoritarios ST405 y ST11, siendo el imipenem el carbapenémico que mayor proporción de aislados con CMI  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  *in vitro* presentó frente a las cepas ST11. Al analizar una posible selección a lo largo del tiempo de aislados con mayores CMIs a imipenem y meropenem, no se observó una tendencia de incremento cuando se consideraron todas la cepas de *K. pneumoniae* en conjunto, ni tampoco cuando se analizaron los dos clones mayoritarios, los cuales presentaban diversidad de valores de CMI que abarcaban todo el rango prácticamente desde el inicio de su aparición.

La mayoría de los aislados de *E. coli* fueron no productores de BLEE. Eran, por tanto, sensibles a cefalosporinas de amplio espectro y aunque por el momento no existen datos clínicos, la ceftazidima ha demostrado en modelos animales ser el antibiótico con mayor actividad frente a este tipo de cepas sólo productoras de carbapenemasa OXA-48 (151, 152).

La amikacina fue el antibiótico más activo frente a todos los aislados productores de carbapenemasa OXA-48 con independencia de la especie bacteriana, seguido de colistina, tigeciclina, minociclina y fosfomicina. Los aminoglucósidos son los antibióticos que mayor eficacia han demostrado en la erradicación microbiológica de infecciones del tracto urinario por enterobacterias resistentes a carbapenémicos en monoterapia, mostrando superioridad frente a colistina y tigeciclina (153), estas diferencias probablemente se deban a las características farmacocinéticas de estos antibióticos, cuya concentración en orina respecto a la amikacina es menor en el caso de la colistina y significativamente menor con la tigeciclina. Pese a ello, sólo debe considerarse el tratamiento con amikacina en monoterapia en infecciones no complicadas como infecciones del tracto urinario o bacteriemias relacionadas con catéter siempre y cuando el catéter haya sido retirado (154). La colistina, una vez resueltas sus particulares características de dosificación y a pesar de que las tasas de mortalidad son más altas en los pacientes tratados con este antibiótico, es otra alternativa en el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas a ser posible en combinación con un carbapenémico por su efecto sinérgico (155) y para evitar la aparición frecuente de resistencias cuando se utiliza en monoterapia (156). Este mismo problema de aparición de resistencias en monoterapia se ha descrito con tigeciclina (157) y fosfomicina (158). Además, la tigeciclina, debido a su actividad

bacteriostática, no es una opción recomendable para el tratamiento de infecciones graves (62).

El 50% de los aislados de *K. pneumoniae* analizados durante el brote fueron sensibles a cefoxitina, este antibiótico se ha propuesto como alternativa a los carbapenémicos en infecciones del tracto urinario producidas por *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (159, 160), pero la escasez de estudios farmacocinéticos y la selección *in vitro* e *in vivo* de resistencias secundarias a la pérdida de porinas (161-164) hacen desaconsejable su utilización siempre y cuando se dispongan de otras alternativas. La resistencia a cefoxitina se utilizó como marcador de alteraciones de la permeabilidad bacteriana para estudiar como afectaba este mecanismo de resistencia al resto de antibióticos. Se observó que las cepas no sensibles a cefoxitina eran también más resistentes a los carbapenémicos, siendo este efecto muy significativo en el caso de meropenem. Este fenómeno se ha descrito en un estudio con cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE (165) en el que las cepas resistentes a cefoxitina presentaban un mayor aumento de la CMI frente a meropenem (entre 8 y 12 diluciones) que frente a imipenem (2 diluciones). Puede concluirse que en cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa OXA-48 las alteraciones de la permeabilidad afectan más al meropenem que al imipenem, diferencias en la afinidad enzimática de OXA-48 o en la tasa de penetración en cepas con alteraciones en la permeabilidad por parte de ambos fármacos podrían explicar este fenómeno. Aunque el secuenciotipo ST405 mostró una mayor proporción de aislados sensibles a cefoxitina que el ST11 (ST405 58% de aislados sensibles frente al 33,9%), no hubo diferencias significativas en la sensibilidad ni en la proporción de aislados con CMI  $\leq 8$  µg/ml a meropenem entre ambas cepas. Cuando se



analizó como afectaba la diferencia de sensibilidad a cefoxitina al resto de antibióticos no betalactámicos, se pudo observar que la resistencia a cefoxitina se vinculaba de manera muy significativa con un aumento de la resistencia a tigeciclina y minociclina, quinolonas (excepto norfloxacino debido probablemente a que el número de cepas analizadas es muy bajo para este antibiótico), fosfomicina y nitrofurantoína; y en menor medida a colistina. Los aminoglucósidos son antibióticos muy solubles en agua; sin embargo, apenas se ven afectados en este análisis, siendo la amikacina el único en el que se observa un moderado incremento de la resistencia. Por lo tanto, el mecanismo de resistencia por modificación enzimática en aminoglucósidos prevalece sobre la alteración en la permeabilidad utilizando como indicador la cefoxitina. Las tetraciclinas, incluyendo la tigeciclina, atraviesan la pared externa de las bacterias gramnegativas formando un complejo tetraciclina-magnesio a través de porinas OmpF y OmpC, siendo el bombeo hacia el exterior celular y la alteración de la permeabilidad los principales mecanismos de resistencia (166), este hecho justifica las diferencias tan importantes observadas entre los aislados sensibles y no sensibles a cefoxitina. También se ha descrito como la alteración en la permeabilidad bacteriana juega un importante papel en el desarrollo o incremento de las resistencias a quinolonas (167, 168) aunque en este caso podría quedar enmascarada por otros mecanismos de resistencia a quinolonas presentes en las cepas ST11 (mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*) y en las cepas ST405 (genes *qnr*). Aunque no se conoce con precisión cual es el mecanismo de acción de la nitrofurantoína, se le ha implicado en la inhibición de diversos enzimas metabólicos relacionados con el metabolismo glucídico y en la inhibición de la síntesis proteica (169). Para ejercer su mecanismo de acción se ha comprobado que necesita una

activación previa por la acción de enzimas nitroreductasas, y se ha demostrado que algunas mutaciones de estos enzimas generan resistencia a la nitrofurantoína (170); no obstante, diversos autores han señalado que la nitrofurantoína es activa incluso en ausencia de la activación por enzimas reductasas (169). Las diferencias que encontramos entre los aislados sensibles y resistentes a cefoxitina con el respecto a su sensibilidad a nitrofurantoína es la mayor observada, cercana al 41%. Moya-Torres y cols. demostraron el papel de la permeabilidad y en concreto de la porina OmpF en el incremento de resistencia a cefoxitina y nitrofurantoína en *S. marcescens* (171). La fosfomicina bloquea la síntesis de los precursores del peptidoglucano por inhibición irreversible del enzima MurA y los mecanismos de resistencia descritos para este antibiótico son muy variados e incluyen alteraciones de la diana, enzimas modificantes, abolición de la inhibición por utilización de una vía alternativa y reducción de la permeabilidad por alteraciones de las proteínas transportadoras de glicerol-3-fosfato o glucosa-6-fosfato (172). En las cepas ST405 y ST11 caracterizadas mediante secuenciación de genomas completos estaba presente el gen de localización cromosómica *fosA*, el cual codifica un enzima glutatión-transferasa capaz de inactivar el antibiótico pero que posee poca trascendencia a la hora de conferir resistencia. Analizando las diferencias de sensibilidad a fosfomicina con respecto a la cefoxitina se comprobó que los aislados no sensibles a cefoxitina son significativamente más resistentes a fosfomicina. Paradójicamente la fosfomicina es una molécula muy liposoluble que utiliza unos transportadores de membrana especiales asociados con el metabolismo glucídico para penetrar en la célula; sin embargo, López-Camacho y cols. observaron resistencia a

fosfomicina dependiente de la pérdida de OmpK36 en aislados clínicos de *K. pneumoniae* ST37 (85).

## **6. Lecciones aprendidas del brote por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48**

La situación actual en el hospital es que, aunque los casos no han disminuido globalmente, sí se ha producido un desplazamiento a favor de pacientes que se detectan en los estudios de colonización y menos casos incidentes en muestras clínicas, debido fundamentalmente a la intensificación en la vigilancia activa que se ha implementado a partir de julio de 2013. Además de la intensificación en la vigilancia, el brote de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 ha introducido importantes cambios en el hospital dirigidos a mejorar las medidas de control de la infección asociada a los cuidados sanitarios, entre los que cabe destacar:

- Refuerzo de las medidas estándares de control de la infección, fundamentalmente: higiene de manos por parte del personal sanitario, higiene del paciente y limpieza de superficies.
- Mejora de la identificación y trazabilidad de los casos mediante alertas en las distintas aplicaciones informáticas de consulta sobre pacientes utilizadas en el hospital.
- Apertura de una planta cohorte con personal específico para la atención de pacientes colonizados y/o infectados enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.
- Diseño y ejecución de mejoras en el control de la infección en servicios y unidades con transmisión activa de enterobacterias productoras de

carbapenemasa OXA-48, asignando en cada una de ellas individuos clave que coordinen y verifiquen el cumplimiento de las medidas.

- Control y optimización del uso de antibióticos, y especialmente del uso no justificado o prolongado de antibióticos de amplio espectro como los carbapenémicos.

La instauración de estas medidas, como se señalaba al principio, no ha erradicado el brote en el complejo hospitalario, probablemente porque la población colonizada subyacente es muy grande, pero ha permitido el control en aquellas plantas en las que se producían casos con transmisión activa evidente entre pacientes.

Aunque los estudios de prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasa en la comunidad son todavía escasos, es probable que en un futuro y tomando como ejemplo la diseminación de *E. coli* BLEE fuera del ámbito hospitalario, sean determinados clones “de alto riesgo” de esta especie los que terminen introduciendo y diseminando los genes de carbapenemasas en la comunidad, siendo *K. pneumoniae* la que mantenga la diseminación de carbapenemasas asociada a los cuidados sanitarios como lo ha estado haciendo en los últimos 30 años con las BLEE. Algunos autores señalan que sería posible prevenir los brotes hospitalarios producidos por bacterias productoras de carbapenemasas tomando como ejemplo las políticas de *search and destroy* llevadas a cabo por los países del norte de Europa para el control de *S. aureus* meticilín-resistente (20). A la espera de que se introduzcan en la práctica clínica nuevos antibióticos activos frente a bacterias gramnegativas multirresistentes, las principales herramientas disponibles son las medidas de control de la infección, con el apoyo de programas de vigilancia epidemiológica. Para que éstas sean

efectivas es imprescindible el apoyo institucional y la implicación de todos los estamentos del hospital en la aplicación de políticas y medidas eficaces para el control de la diseminación de bacterias multirresistentes.

## Conclusiones



1. La rápida diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en nuestro medio hospitalario, con un comienzo abrupto y una evolución multifocal muy dispersa, sugiere la presencia de un reservorio de pacientes infectados o colonizados no detectados.
2. La mayoría de los casos se detectaron en muestras de colonización, siendo la orina la muestra clínica más frecuente seguida de las muestras de origen quirúrgico.
3. La infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 de inicio comunitario fue una entidad clínica relativamente frecuente, pero todos los casos estuvieron relacionados con la asistencia sanitaria.
4. *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 fue la especie más frecuente y mostró un patrón de diseminación policlonal, aunque con dos secuenciotipos predominantes: ST405 y ST11, siendo el primero el secuenciotipo asociado al origen del brote, dominante durante los dos primeros años, y desplazado posteriormente por el ST11.
5. Amikacina fue el antibiótico que con mayor frecuencia mantuvo actividad *in vitro* frente a las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 con independencia de la especie.
6. El ertapenem fue el antibiótico carbapenémico con el porcentaje de resistencia más alto y con la CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> más elevadas, siendo por tanto el más sensible para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.
7. Las CMIs a imipenem y meropenem fueron en su mayoría menores o iguales a 8 µg/ml pudiendo ser, siempre en combinación con otro antibiótico activo, potencialmente adecuados en el tratamiento de infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.
8. Los aislados de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 resistentes a cefoxitina fueron significativamente más resistentes



a meropenem, tigeciclina y minociclina, quinolonas, fosfomicina y nitrofurantoína.

## **Bibliografía**



1. Versalovic J, Carroll CK, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. Manual of Clinical Microbiology. I. 10th ed 2011.
2. Versalovic J, Carroll CK, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas and other Enterobacteriaceae*. Manual of Clinical Microbiology. I. 10th ed 2011.
3. Versalovic J, Carroll CK, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Yersinia*. Manual of Clinical Microbiology. I. 10th ed 2011.
4. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635-8. PubMed PMID: 15831718.
5. Moellering RJ. Cefamandole a new member of the cephalosporin family. *J Infect Dis*. 1978;137(Suppl):S2-S9.
6. O'Callaghan CH SR, Griffiths A, Thornton JE. Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic: activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9(3):511-9.
7. Garzone P, Lyon J, Yu VL. Third-generation and investigational cephalosporins: I. Structure-activity relationships and pharmacokinetic review. *Drug intelligence & clinical pharmacy*. 1983 Jul-Aug;17(7-8):507-15. PubMed PMID: 6347596.
8. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983 Nov-Dec;11(6):315-7. PubMed PMID: 6321357.
9. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 May;34(5):755-8. PubMed PMID: 2193618. Pubmed Central PMCID: 171686.
10. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jan;35(1):147-51. PubMed PMID: 1901695. Pubmed Central PMCID: 244956.
11. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Apr;39(4):824-9. PubMed PMID: 7785978. Pubmed Central PMCID: 162636.
12. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-

resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1151-61. PubMed PMID: 11257029. Pubmed Central PMCID: 90438.

13. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009 Apr;9(4):228-36. PubMed PMID: 19324295.

14. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill*. 2008 Jan 24;13(4). PubMed PMID: 18445397.

15. Kassis-Chikhani N, Decre D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan;57(1):142-5. PubMed PMID: 16284103.

16. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007 Nov 1;45(9):1171-8. PubMed PMID: 17918078.

17. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010 Nov 18;15(46). PubMed PMID: 21144429.

18. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5046-54. PubMed PMID: 19770275. Pubmed Central PMCID: 2786356.

19. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2950-4. PubMed PMID: 18519712.

20. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1791-8. PubMed PMID: 22000347. Pubmed Central PMCID: 3310682.

21. Oteo J, Calbo E, Rodriguez-Bano J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, et al. [The threat of the carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain: positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2014 Dec;32(10):666-70. PubMed PMID: 24767691. La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC.

22. Pano Pardo JR, Serrano Villar S, Ramos Ramos JC, Pintado V. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014 Dec;32 Suppl 4:41-8. PubMed PMID: 25542051.
23. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics*. 1979 Jan;32(1):1-12. PubMed PMID: 761989.
24. Martinez MJ, Garcia MI, Sanchez EG, Sanchez JE. [Available carbapenems: Properties and differences]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2010 Sep;28 Suppl 2:53-64. PubMed PMID: 21130931.
25. Suarez C, Gudiol F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2009 Feb;27(2):116-29. PubMed PMID: 19254642.
26. Davies TA, Shang W, Bush K, Flamm RK. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1510-2. PubMed PMID: 18250190. Pubmed Central PMCID: 2292531.
27. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various beta-lactamase resistance mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 May;52(1):71-4. PubMed PMID: 15878447.
28. Mendes RE, Rhomberg PR, Bell JM, Turnidge JD, Sader HS. Doripenem activity tested against a global collection of Enterobacteriaceae, including isolates resistant to other extended-spectrum agents. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Apr;63(4):415-25. PubMed PMID: 19249175.
29. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews Microbiology*. 2008 Dec;6(12):893-903. PubMed PMID: 18997824.
30. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2003 Dec;67(4):593-656. PubMed PMID: 14665678. Pubmed Central PMCID: 309051.
31. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med*. 2012 May;18(5):263-72. PubMed PMID: 22480775.
32. Lopez-Camacho E, Gomez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galvan B, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Oct 23. PubMed PMID: 24155060.

33. Garcia-Fernandez A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, et al. An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4178-84. PubMed PMID: 20660683. Pubmed Central PMCID: 2944588.
34. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar;8(3):159-66. PubMed PMID: 18291338.
35. Bornet C, Chollet R, Mallea M, Chevalier J, Davin-Regli A, Pages JM, et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003 Feb 21;301(4):985-90. PubMed PMID: 12589810.
36. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440-58, table of contents. PubMed PMID: 17630334. Pubmed Central PMCID: 1932750.
37. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hackel M, Johnson JL, Badal RE. *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing KPC beta-lactamase in Israel, Puerto Rico, Colombia and Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Oct;34(4):384-5. PubMed PMID: 19560904.
38. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis*. 2011 Apr 1;52(7):848-55. PubMed PMID: 21317398.
39. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, Carmeli Y, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(28). PubMed PMID: 23870096.
40. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Feb;51(2):763-5. PubMed PMID: 17145797. Pubmed Central PMCID: 1797727.
41. Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijon D, Pintado V, Valverde A, et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Nov;68(11):2487-92. PubMed PMID: 23788480.
42. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005 Apr;18(2):306-25. PubMed PMID: 15831827. Pubmed Central PMCID: 1082798.

43. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Nov;52(11):4194-7. PubMed PMID: 18765691. Pubmed Central PMCID: 2573105.
44. Zhao WH, Hu ZQ. IMP-type metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Critical reviews in microbiology*. 2011 Aug;37(3):214-26. PubMed PMID: 21707466.
45. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol*. 2011 Mar;6(3):317-33. PubMed PMID: 21449842.
46. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis*. 2011 Mar;11(3):164. PubMed PMID: 21371654.
47. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect*. May;18(5):E144-8. PubMed PMID: 22404169.
48. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):5403-7. PubMed PMID: 21859933. Pubmed Central PMCID: 3195013.
49. Bercot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Oct;66(10):2295-7. PubMed PMID: 21807739.
50. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):355-62. PubMed PMID: 21478057.
51. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2013 May;19(5):E230-2. PubMed PMID: 23397897.
52. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15-22. PubMed PMID: 14693513. Pubmed Central PMCID: 310167.
53. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*. 2008;54(2):101-6. PubMed PMID: 18303258.



54. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Oct;55(10):4896-9. PubMed PMID: 21768505. Pubmed Central PMCID: 3186949.
55. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):1274-8. PubMed PMID: 21189345. Pubmed Central PMCID: 3067112.
56. Aubert D, Naas T, Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J Bacteriol*. 2006 Sep;188(18):6506-14. PubMed PMID: 16952941. Pubmed Central PMCID: 1595497.
57. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1369-73. PubMed PMID: 20086157. Pubmed Central PMCID: 2825965.
58. Giani T, Conte V, Di Pilato V, Aschbacher R, Weber C, Larcher C, et al. *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):2211-3. PubMed PMID: 22290939. Pubmed Central PMCID: 3318333.
59. Poirel L, Heritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):348-51. PubMed PMID: 14693565. Pubmed Central PMCID: 310178.
60. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4405-7. PubMed PMID: 21746953. Pubmed Central PMCID: 3165332.
61. Martinez-Martinez L, Gonzalez-Lopez JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2014 Dec;32 Suppl 4:4-9. PubMed PMID: 25542046.
62. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct;25(4):682-707. PubMed PMID: 23034326. Pubmed Central PMCID: 3485753.
63. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012 May;18(5):413-31. PubMed PMID: 22507109.

64. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, et al. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the "menace" arrives in the new world. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb;51(2):680-3. PubMed PMID: 23175248. Pubmed Central PMCID: 3553872.
65. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):821-30. PubMed PMID: 24930781.
66. Potron A, Poirel L, Bussy F, Nordmann P. Occurrence of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene blaOXA-48 in the environment in Morocco. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):5413-4. PubMed PMID: 21876064. Pubmed Central PMCID: 3195045.
67. Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in the Moroccan community. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Jul;73(3):290-1. PubMed PMID: 22521054.
68. Rodriguez-Bano J, Pano-Pardo JR, Alvarez-Rocha L, Asensio A, Calbo E, Cercenado E, et al. [Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH consensus document]. *Farmacia hospitalaria : organo oficial de expresion cientifica de la Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria*. 2012 Jan-Feb;36(1):33 e1-0. PubMed PMID: 22137161. Programas de optimizacion de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales espanoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH.
69. Rodriguez-Bano J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, Asensio A, Delgado T, Garcia-Arcal D, et al. [Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals. A GEIH-SEIMC and SEMPSPH consensus document]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2008 May;26(5):285-98. PubMed PMID: 18479646. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en hospitales espanoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH.
70. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 4<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012.
71. del Castillo MC, Lopez-Cerezo L, Casal M, Pascual A. [Evaluation of chromID ESBL medium for detecting carriers of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2011 Jun-Jul;29(6):471-2. PubMed PMID: 21620528.
72. CLSI W, PA, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22*. 2012.

73. CLSI W, PA, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21. 2011.
74. FDA. Tygacil (Tigecycline) for Injection [package insert]2005. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/021821s021lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021821s021lbl.pdf).
75. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. APMIS. 2004 Nov-Dec;112(11-12):815-37. PubMed PMID: 15638839.
76. Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009 Feb;53(2):465-75. PubMed PMID: 19015360. Pubmed Central PMCID: 2630642.
77. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. J Clin Microbiol. 2009 Oct;47(10):3261-5. PubMed PMID: 19675211. Pubmed Central PMCID: 2756929.
78. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002 Jun;8(6):321-31. PubMed PMID: 12084099.
79. Swayne RL, Ludlam HA, Shet VG, Woodford N, Curran MD. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents. 2011 Jul;38(1):35-8. PubMed PMID: 21549572.
80. Rodriguez Martinez JM, Diaz-de Alba P, Lopez C, Ruiz-Carrascoso G, Gomez-Gil R, Pascual A. Presence of quinolone resistance to qnrB1 genes and blaOXA-48 carbapenemase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Spain. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2014 Aug-Sep;32(7):441-2. PubMed PMID: 24746402.
81. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. Journal of clinical microbiology. 2005 Aug;43(8):4178-82. PubMed PMID: 16081970. Pubmed Central PMCID: 1233940.
82. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977 Dec;74(12):5463-7. PubMed PMID: 271968. Pubmed Central PMCID: 431765.
83. Wesselink JJ, Lopez-Camacho E, de la Pena S, Ramos-Ruiz R, Ruiz-Carrascoso G, Lusa-Bernal S, et al. Genome sequence of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella*

pneumoniae KpO3210. J Bacteriol. 2012 Dec;194(24):6981. PubMed PMID: 23209233. Pubmed Central PMCID: 3510562.

84. Villa J, Viedma E, Branäs P, Mingorance J, Chaves F. Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48. Genome announcements. 2014;2(4). PubMed PMID: 25081259. Pubmed Central PMCID: 4118062.

85. Lopez-Camacho E, Gomez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galvan B, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. J Antimicrob Chemother. 2014 Mar;69(3):632-6. PubMed PMID: 24155060.

86. Pano-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. J Antimicrob Chemother. 2013 Jan;68(1):89-96. PubMed PMID: 23045224.

87. Navarro-San Francisco C, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, Moreno-Ramos F, Rico-Nieto A, Ruiz-Carrascoso G, et al. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a major clinical challenge. Clin Microbiol Infect. 2013 Feb;19(2):E72-9. PubMed PMID: 23231088.

88. Cendejas E, Gomez-Gil R, Gomez-Sanchez P, Mingorance J. Detection and characterization of Enterobacteriaceae producing metallo-beta-lactamases in a tertiary-care hospital in Spain. Clin Microbiol Infect. 2010 Feb;16(2):181-3. PubMed PMID: 19624502.

89. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. J Antimicrob Chemother. 2015 Jul;70(7):2133-43. PubMed PMID: 25900159.

90. Skopkova-Zarnayova M, Siebor E, Rovna D, Bujdakova H, Neuwirth C. Outer membrane protein profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates that differ in cefoxitin resistance. FEMS microbiology letters. 2005 Feb 1;243(1):197-203. PubMed PMID: 15668019.

91. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81. PubMed PMID: 21793988.

92. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Front Microbiol. 4:48. PubMed PMID: 23504089.

93. Tortola MT, Lavilla S, Miro E, Gonzalez JJ, Larrosa N, Sabate M, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3492-4. PubMed PMID: 16048967. Pubmed Central PMCID: 1196258.
94. Miro E, Agüero J, Larrosa MN, Fernandez A, Conejo MC, Bou G, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Feb;32(2):253-9. PubMed PMID: 22956023.
95. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina JM, Perez-Vazquez M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec;57(12):6344-7. PubMed PMID: 24041898. Pubmed Central PMCID: 3837857.
96. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. Dec;17(12):E24-6. PubMed PMID: 21973185.
97. Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. Sep;55(9):4398-401. PubMed PMID: 21746954.
98. Branas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jul;46(1):111-6. PubMed PMID: 25914088.
99. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in microbiology*. 2006 Sep;14(9):413-20. PubMed PMID: 16876996.
100. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1597-606. PubMed PMID: 22499996.
101. CLSI W, PA, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement (June 2010 update) M100-S20-U. 2010.
102. Poirel L, Ros A, Carrer A, Fortineau N, Carricajo A, Berthelot P, et al. Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *J Antimicrob Chemother*. May;66(5):1181-2. PubMed PMID: 21393189.
103. Cremet L, Bourigault C, Lepelletier D, Guillouzouic A, Juvin ME, Reynaud A, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* highlighting the interspecies transferability of the blaOXA-48 gene in the gut flora. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Apr;67(4):1041-3. PubMed PMID: 22223227.

104. Levast M, Poirel L, Carrer A, Deiber M, Decroisette E, Mallaval FO, et al. Transfer of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. *J Antimicrob Chemother.* Apr;66(4):944-5. PubMed PMID: 21393135.
105. Gomez-Gil MR, Pano-Pardo JR, Romero-Gomez MP, Gasior M, Lorenzo M, Quiles I, et al. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Dec;65(12):2695-7. PubMed PMID: 20851814.
106. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, van der Zee A, van Burgh S, de Greeff SC, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill.* 2014;19(9). PubMed PMID: 24626209.
107. Semin-Pelletier B, Cazet L, Bourigault C, Juvin ME, Boutoille D, Raffi F, et al. Challenges of controlling a large outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French university hospital. *J Hosp Infect.* 2015 Apr;89(4):248-53. PubMed PMID: 25601745.
108. Gottesman T, Agmon O, Shwartz O, Dan M. Household transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2008 May;14(5):859-60. PubMed PMID: 18439387. Pubmed Central PMCID: 2600260.
109. Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, et al. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec;68(12):2802-8. PubMed PMID: 23833179.
110. Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Grisold AJ, et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Feb;20(2):O132-4. PubMed PMID: 24033741.
111. Zurfluh K, Nuesch-Inderbinen MT, Poirel L, Nordmann P, Hachler H, Stephan R. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 beta-lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrobial resistance and infection control.* 2015;4:9. PubMed PMID: 25834728. Pubmed Central PMCID: 4381362.
112. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Annals of internal medicine.* 2002 Nov 19;137(10):791-7. PubMed PMID: 12435215.
113. Arana DM, Saez D, Garcia-Hierro P, Bautista V, Fernandez-Romero S, Angel de la Cal M, et al. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Feb;21(2):148 e1-4. PubMed PMID: 25596781.

114. Toval F, Kohler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb;52(2):407-18. PubMed PMID: 24478469. Pubmed Central PMCID: 3911323.
115. Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Emergence of *Escherichia coli*, Co-Producing NDM-1 and OXA-48 Carbapenemases, in Urinary Isolates, at a Tertiary Care Centre at Central India. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014 Jun;8(6):DC01-4. PubMed PMID: 25120976. Pubmed Central PMCID: 4129265.
116. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Sep;44(3):260-2. PubMed PMID: 25123809.
117. Poirel L, Abdelaziz MO, Bernabeu S, Nordmann P. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):90-1. PubMed PMID: 23040010.
118. Kotsanas D, Wijesooriya WR, Korman TM, Gillespie EE, Wright L, Snook K, et al. "Down the drain": carbapenem-resistant bacteria in intensive care unit patients and handwashing sinks. *The Medical journal of Australia*. 2013 Mar 18;198(5):267-9. PubMed PMID: 23496403.
119. Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen O. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving Intergenous plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLoS One*. 2013;8(3):e59015. PubMed PMID: 23536849. Pubmed Central PMCID: 3594221.
120. Vergara-Lopez S, Dominguez MC, Conejo MC, Pascual A, Rodriguez-Bano J. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Nov;19(11):E490-8. PubMed PMID: 23829434.
121. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jan;58(1):467-71. PubMed PMID: 24189247.
122. Wrenn C, O'Brien D, Keating D, Roche C, Rose L, Ronayne A, et al. Investigation of the first outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *J Hosp Infect*. 2014 May;87(1):41-6. PubMed PMID: 24746608.
123. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul;19(3):512-30. PubMed PMID: 16847083. Pubmed Central PMCID: 1539107.

124. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013;18(4):20380. PubMed PMID: 23369389.
125. Oteo J, Ortega A, Bartolome R, Bou G, Conejo C, Fernandez-Martinez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jun;59(6):3406-12. PubMed PMID: 25824224. Pubmed Central PMCID: 4432182.
126. Lopez-Cerero L, Almirante B. Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: reservoirs and transmission mechanisms. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014 Dec;32 Suppl 4:10-6. PubMed PMID: 25542047.
127. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):130-6. PubMed PMID: 23070171. Pubmed Central PMCID: 3535978.
128. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Aug;69(8):2091-7. PubMed PMID: 24739146.
129. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina JM, Perez-Vazquez M, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain (2012). *Antimicrob Agents Chemother*. Sep 16. PubMed PMID: 24041898.
130. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Feb;68(2):317-21. PubMed PMID: 23034714.
131. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*. 2011 Sep;35(5):736-55. PubMed PMID: 21303394.
132. Mansour W, Grami R, Ben Haj Khalifa A, Dahmen S, Chatre P, Haenni M, et al. Dissemination of multidrug-resistant bla/IncFIIK plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital- and community-acquired human infections in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Jul 29. PubMed PMID: 26341707.
133. Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurankova J, Sevcikova A, et al. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing



Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Dec;40(6):510-5. PubMed PMID: 23043911.

134. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1510-3. PubMed PMID: 21543359.

135. Bonura C, Giuffre M, Aleo A, Fasciana T, Di Bernardo F, Stampone T, et al. An Update of the Evolving Epidemic of blaKPC Carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132936. PubMed PMID: 26177547. Pubmed Central PMCID: 4503429.

136. Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN, Mendes RE. Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microb Drug Resist*. 2013 Aug;19(4):295-7. PubMed PMID: 23530541.

137. Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalie L, van der Mee-Marquet N, et al. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Dec;20(12):O1121-3. PubMed PMID: 24942039.

138. Lafeuille E, Decre D, Mahjoub-Messai F, Bidet P, Arlet G, Bingen E. OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Libyan patients. *Microb Drug Resist*. 2013 Dec;19(6):491-7. PubMed PMID: 23808959.

139. Yan JJ, Wang MC, Zheng PX, Tsai LH, Wu JJ. Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *New microbes and new infections*. 2015 May;5:1-4. PubMed PMID: 25834737. Pubmed Central PMCID: 4366441.

140. Qu TT, Zhou JC, Jiang Y, Shi KR, Li B, Shen P, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in East China. *BMC infectious diseases*. 2015;15:161. PubMed PMID: 25886859. Pubmed Central PMCID: 4381403.

141. Liu YM, Li BB, Zhang YY, Zhang W, Shen H, Li H, et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Sep;58(9):5379-85. PubMed PMID: 24982067. Pubmed Central PMCID: 4135864.

142. Chung DR, Lee H, Park MH, Jung SI, Chang HH, Kim YS, et al. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Apr;31(4):481-6. PubMed PMID: 21739348.

143. Jung SW, Chae HJ, Park YJ, Yu JK, Kim SY, Lee HK, et al. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of

*Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Epidemiology and infection*. 2013 Feb;141(2):334-40. PubMed PMID: 22578630.

144. Decre D, Verdet C, Emirian A, Le Gourrierec T, Petit JC, Offenstadt G, et al. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3012-4. PubMed PMID: 21677064. Pubmed Central PMCID: 3147753.

145. Gundestrup S, Struve C, Stahlhut SG, Hansen DS. First Case of Liver Abscess in Scandinavia Due to the International Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* Clone ST23. *The open microbiology journal*. 2014;8:22-4. PubMed PMID: 24688609. Pubmed Central PMCID: 3968548.

146. Cejas D, Fernandez Canigia L, Rincon Cruz G, Elena AX, Maldonado I, Gutkind GO, et al. First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas. *J Clin Microbiol*. 2014 Sep;52(9):3483-5. PubMed PMID: 25031447. Pubmed Central PMCID: 4313191.

147. Barguigua A, Zerouali K, Katfy K, El Otmani F, Timinouni M, Elmdaghri N. Occurrence of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2015 Apr;31:142-8. PubMed PMID: 25620375.

148. Fernandez J, Montero I, Martinez O, Fleites A, Poirel L, Nordmann P, et al. Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Aug 7. PubMed PMID: 26307466.

149. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Dec;10(12):1393-404. PubMed PMID: 23253318.

150. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):862-72. PubMed PMID: 24890393.

151. Mimos O, Gregoire N, Poirel L, Marliat M, Couet W, Nordmann P. Broad-spectrum beta-lactam antibiotics for treating experimental peritonitis in mice due to *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2759-60. PubMed PMID: 22330912. Pubmed Central PMCID: 3346608.

152. Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. Efficacy of humanized carbapenem and ceftazidime regimens against *Enterobacteriaceae* producing OXA-48 carbapenemase in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1678-83. PubMed PMID: 24379200. Pubmed Central PMCID: 3957853.

153. Satlin MJ, Kubin CJ, Blumenthal JS, Cohen AB, Furuya EY, Wilson SJ, et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5893-9. PubMed PMID: 21968368. Pubmed Central PMCID: 3232750.
154. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Gudiol C, Martinez JA. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2014 Dec;32 Suppl 4:49-55. PubMed PMID: 25542052.
155. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):5104-11. PubMed PMID: 23917322. Pubmed Central PMCID: 3811454.
156. Petrosillo N, Giannella M, Antonelli M, Antonini M, Barsic B, Belancic L, et al. Clinical experience of colistin-glycopeptide combination in critically ill patients infected with Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):851-8. PubMed PMID: 24277037. Pubmed Central PMCID: 3910896.
157. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):895-904. PubMed PMID: 18676620.
158. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 1;46(7):1069-77. PubMed PMID: 18444827.
159. Boyer M, Bignon A, Dessein R, Faure K, Guery B, Kipnis E. [Cefoxitin and ESBL]. *Medecine et maladies infectieuses*. 2012 Mar;42(3):126-8. PubMed PMID: 22341663.
160. Guet-Revillet H, Emirian A, Groh M, Nebbad-Lechani B, Weiss E, Join-Lambert O, et al. Pharmacological study of cefoxitin as an alternative antibiotic therapy to carbapenems in treatment of urinary tract infections due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4899-901. PubMed PMID: 24777104. Pubmed Central PMCID: 4135984.
161. Ananthan S, Subha A. Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian journal of medical microbiology*. 2005 Jan;23(1):20-3. PubMed PMID: 15928416.
162. Pangon B, Bizet C, Bure A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, et al. In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase. *J Infect Dis*. 1989 May;159(5):1005-6. PubMed PMID: 2651531.

163. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Feb;40(2):342-8. PubMed PMID: 8834877. Pubmed Central PMCID: 163113.
164. Palasubramaniam S, Muniandy S, Navaratnam P. Resistance to extended-spectrum beta-lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Malaysia. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2009 Apr;42(2):129-33. PubMed PMID: 19597644.
165. Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jul;42(7):1636-40. PubMed PMID: 9660996. Pubmed Central PMCID: 105658.
166. Vicente D, Perez-Trallero E. [Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2010 Feb;28(2):122-30. PubMed PMID: 20097452.
167. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:82-9. PubMed PMID: 18154531.
168. Chen FJ, Lauderdale TL, Ho M, Lo HJ. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 2003 Fall;9(3):265-71. PubMed PMID: 12959405.
169. McOsker CC, Fitzpatrick PM. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother*. 1994 May;33 Suppl A:23-30. PubMed PMID: 7928834.
170. Sandegren L, Lindqvist A, Kahlmeter G, Andersson DI. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Sep;62(3):495-503. PubMed PMID: 18544599.
171. Moya-Torres A, Mulvey MR, Kumar A, Oresnik IJ, Brassinga AK. The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Microbiology*. 2014 Sep;160(Pt 9):1882-92. PubMed PMID: 25015362.
172. Nikolaidis I, Favini-Stabile S, Dessen A. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2014 Mar;23(3):243-59. PubMed PMID: 24375653. Pubmed Central PMCID: 3945833.



## **Abstract/Resumen**



## Microbiological and Clinical-epidemiological Features of OXA-48 Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the Setting of a Hospital Outbreak

### Introduction

The spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae constitutes a significant threat to healthcare systems. The species belonging to the *Enterobacteriaceae* family are the main causative of health care associated infections and carbapenems remain the last frontier of optimal antimicrobial therapy for a significant and growing proportion of patients with severe infections caused by Enterobacteriaceae.

First described in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* from a patient hospitalized in Turkey in 2001, OXA-48 is a carbapenem hydrolyzing oxacillinase with carbapenem-hydrolysing activity. Since then, OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae have been isolated in several countries in northern Africa, the Middle East and Europe. OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae have been involved in nosocomial outbreaks and is now a matter of major clinical concern. This carbapenemase is encoded by the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene, which is part of the Tn1999 composite transposon made of two copies of the insertion sequence IS1999. OXA-48-producing isolates are frequently multidrug-resistant, because they combine multiple resistance mechanisms. This enzyme shows different hydrolysing activities against betalactam antibiotics, with high activity against penicillins but only low activity against carbapenems. OXA-48 carbapenemase has very weak activity against third-generation and fourth-generation cephalosporins; however, these are seldom a therapeutic option because other betalactamases, such as extended-spectrum betalactamases, are frequently associated.



## Objectives and results

The aim of this Doctoral thesis is to describe the microbiological, epidemiological and clinical features of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the setting of a hospital-wide outbreak occurred in a tertiary university teaching hospital complex between December 2010 and June 2013.

In December 2010 four isolates of *K. pneumoniae* were obtained that showed an extended-spectrum betalactamase phenotype accompanied with high resistance to amoxicillin/clavulanic acid and piperacillin/tazobactam combinations, variable decreased susceptibility to carbapenems, and resistance to fluoroquinolones (but susceptible to acid nalidixic), co-trimoxazole and aminoglycosides (gentamicin and tobramycin). Carbapenemase production was suggested because of the positive modified Hodge test (MHT). Metallo-beta-lactamases were discarded if carbapenemase activity was not inhibited by EDTA. PCR analyses and sequencing detected *bla*<sub>OXA-48</sub> gene. Carbapenem resistance was found to be variable and sometimes difficult to detect. In addition, records of the Microbiology laboratory were reviewed and all available frozen isolates of phenotypically similar *K. pneumoniae* were evaluated, searching for carbapenemase production and the presence of *bla*<sub>OXA-48</sub>. Three isolates could be detected retrospectively dating back to April 2010. From the beginning, the outbreak had a widespread dissemination with a geographically scattered pattern, at the end of the study 37 hospitalization units had been affected. The medical intensive care unit was the ward with the largest number of cases followed by the neurosurgery/vascular surgery ward and adult hematology ward.

At the end of the study 473 patients were colonized or infected with OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Two hundred and seventy eight patients (58.7%) were men and the median age was 72 years (range 0–98 years). The 57.3% of the patients were diagnosed in colonization samples. The most frequent source of infection was urine (17.8% of the patients), followed by surgical site infections (9.5%). The 19.6% of the patients had an episode of bacteraemia and the 22.8% had a community onset infection caused by OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *K. pneumoniae* (90.2%) and *E. coli* (5.6%) were the two species most frequently isolated in both, clinical and surveillance samples. The clinical and epidemiological data collected retrospectively in eighty patients with OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical samples and forty patients with bacteraemia showed a crude mortality of 47.5% and 65%, respectively. Receiving systemic antimicrobials previously, to have had at least one surgery, presence of frequent comorbid conditions, medical devices (central venous and/or urinary catheter) and prolonged hospital stays were clinical aspects commonly found in both groups.

Automated rep-PCR and MLST typing showed a polyclonal pattern for *K. pneumoniae* with two major sequence types: ST405 in the beginning of the outbreak and later the ST11 high-risk clon that displaced the pre-existing ST405. The whole genome sequencing of a representative of ST405 and ST11 highlighted the presence of genes and mutations related to antibiotic resistance. The resistome composition was in agreement with the results observed phenotypically (antibiotic resistance profiles).

The values of MIC<sub>50</sub> (range 0.25 to >32) for ertapenem, imipenem and meropenem were 16, 4 and 2 µg/ml, respectively. The 83.4% and 81.5% of

*K. pneumoniae* isolates had MIC > 8 µg/ml for imipenem and meropenem, these isolates could be treated with high-dose of carbapenem and prolonged infusion regimens. *K. pneumoniae* isolates were resistant to nearly all antibiotics tested and the most frequently preserved antibiotics were amikacin (96.4% of the isolates were susceptible), colistin (82%), tigecycline (70.4%) and fosfomycin (48.3%). There were significant differences on susceptibility patterns for betalactam and non-betalactam antibiotics between ST405 and ST11, and ceftazidime susceptible and non-susceptible isolates. One *K. pneumoniae* isolate were resistant to all the antibiotics tested (pan-drug resistant) and 40 isolates recovered from 33 patients were considered extensively drug-resistant.

## Conclusions

1. The rapid spread and sudden beginning with a widely scattered pattern of the OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae outbreak, suggest that an undetected reservoir of patients colonized or infected could be involved.
2. The colonization samples were the most frequent sample for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae carriers followed by urine and surgical samples.
3. The community onset infections was not uncommon and all the cases were related to healthcare-associated infections.
4. The most common OXA-48 carbapenemase-producing enterobacteria isolated was *K. pneumoniae* with a polyclonal spread although two sequence types were predominant: ST405 and ST11, the ST405 clon was related to the origin of the outbreak and was displaced by the ST11 clon while the outbreak progressed.

5. Amikacin was the most active antibiotic *in vitro* against all OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.
6. The carbapenem with the most non-susceptible rate and higher MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values was ertapenem. Ertapenem was the most sensitive carbapenem for suspecting the presence of OXA-48 carbapenemase-producing enterobacteria.
7. Most of the MICs values for imipenem and meropenem were  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ , these carbapenems could be useful for the treatment of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infections in combination with a plenty susceptible antibiotic.
8. The *K. pneumoniae* isolates non-susceptible to cefoxitin had significantly higher rates of resistance for meropenem, tigecycline and minocycline, quinolones, fosfomycin and nitrofurantoin.

## **Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el contexto de un brote hospitalario**

### **Introducción**

La diseminación de enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos constituye una importante amenaza para los sistemas de salud. Las especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* son la principal causa de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria, siendo los antibióticos carbapenémicos el último escalón terapéutico para una proporción cada vez mayor de pacientes con infecciones graves producidas por enterobacterias.

La carbapenemasa OXA-48 es un enzima oxacilinas con actividad hidrolítica para los antibióticos carbapenémicos que se describió por primera vez en un paciente hospitalizado en Turquía en el año 2001. Desde entonces las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 han sido detectadas en numerosos países en el norte de África, Oriente Medio y Europa. Las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 han estado implicadas en brotes nosocomiales y son un problema de gran trascendencia clínica. El gen que codifica para la carbapenemasa OXA-48 (*bla<sub>OXA-48</sub>*) forma parte del transposón Tn1999 que está flanqueado por dos copias de la secuencia de inserción IS1999. Los aislados productores de carbapenemasa OXA-48 son muy frecuentemente multirresistentes a los antibióticos por la presencia simultánea de diversos mecanismos de resistencia y muestran diferente actividad hidrolítica frente a los betalactámicos que se traduce en una elevada actividad frente a las penicilinas, baja actividad frente a los carbapenémicos y muy débil actividad

frente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación aunque raramente constituyen una opción terapéutica por la presencia concomitante de BLEE.

## Objetivos y resultados

El objetivo de esta Tesis Doctoral es describir las características microbiológicas, epidemiológicas y clínicas de las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el contexto de un gran brote hospitalario ocurrido en un hospital universitario terciario entre diciembre de 2010 y junio de 2013.

En diciembre de 2010 se detectaron cuatro aislados de *K. pneumoniae* que presentaban un fenotipo productor de BLEE pero con elevada resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam, una disminución de la sensibilidad a carbapenémicos variable, resistencia a fluorquinolonas pero sensibles a ácido nalidíxico, resistentes a cotrimoxazol, gentamicina y tobramicina. La presencia de un test de Hodge modificado positivo sugería la presencia de una carbapenemasa. La ausencia de inhibición de la actividad carbapenemasa en presencia de EDTA descartó la presencia de una metalobetalactamasa. Finalmente se detectó la presencia del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> mediante PCR y secuenciación. La resistencia a los carbapenémicos fue en muchas ocasiones variable y difícil de detectar. Se revisaron patrones de resistencia similares en *K. pneumoniae* de manera retrospectiva para detectar la producción de carbapenemasa OXA-48 encontrándose 3 aislados hasta 8 meses antes del inicio del brote. Desde el comienzo el brote tuvo una rápida y dispersa diseminación viéndose afectadas 37 unidades al finalizar el estudio. La Unidad de Cuidados Intensivos Médica fue la planta

que el mayor número de casos registró seguida de la Unidad de Neurocirugía y Cirugía Vascular y la Unidad de Hematología de adultos.

Al terminar el estudio se habían detectado 437 pacientes colonizados o infectados por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48. Doscientos setenta y ocho pacientes (58,7%) eran hombres y la mediana de edad fue de 72 años (rango: 0-98 años). El 57,3% de los pacientes la primera muestra incidente fueron muestras de colonización. El lugar de infección más frecuente fue la orina (17,8% de los pacientes) seguida de la infección quirúrgica (9,5%). El 19,6% de los pacientes presentaron bacteriemia y el 22,8% tuvieron una infección de origen comunitario. Las especies aisladas con más frecuencia tanto en muestras clínicas como de colonización fueron *K. pneumoniae* (90,2%) y *E. coli* (5,6%). Los datos clínicos y epidemiológicos recogidos de manera retrospectiva en 80 pacientes con aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en muestras clínicas y 40 pacientes con bacteriemia dieron como resultado una mortalidad cruda del 47,5% y 65% respectivamente. Las características clínicas comunes encontradas en ambos grupos fueron: haber recibido antibioterapia previa, presencia frecuente de comorbilidades, tener dispositivos médicos (catéter venoso central y/o catéter urinario) y estancias prolongadas en el hospital.

La tipificación molecular de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 mediante rep-PCR automatizada y MLST mostraron un patrón policlonal aunque con dos secuenciotipos predominantes: ST405 al comienzo del brote y posteriormente el ST11 que desplazó al anterior. La secuenciación de genomas completos de un representante de cada clon permitió determinar los genes y marcadores de

resistencia a antibióticos, los cuales estaban en concordancia con los resultados de los estudios fenotípicos de resistencia a antibióticos.

Los valores de CMI<sub>50</sub> (rango: 0,25->32) para ertapenem, imipenem y meropenem fueron 16, 4 y 2 µg/ml respectivamente. El 83,4% y 81,5% de los aislados de *K. pneumoniae* tuvieron una CMI >8 µg/ml para imipenem y meropenem, pudiéndose tratar estas cepas con altas dosis de carbapenémicos en infusión prolongada. Los aislados de *K. pneumoniae* fueron prácticamente resistentes a la mayoría de los antibióticos excepto amikacina (96,4% de aislados sensibles), colistina (82%), tigeciclina (70,4%) y fosfomicina (48,3%). Hubo diferencias significativas en los perfiles de sensibilidad a los antibióticos betalactámicos y no betalactámicos entre las cepas ST405 y ST11 y entre los aislados sensibles y no sensibles a cefoxitina. Un aislado de *K. pneumoniae* fue resistente a todos los antibióticos (panresistente) y 40 aislados obtenidos de 33 pacientes se consideraron como extremadamente resistentes.

## Conclusiones

1. La rápida diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en nuestro medio hospitalario, con un comienzo abrupto y una evolución multifocal muy dispersa, sugiere la presencia de un reservorio de pacientes infectados o colonizados no detectados.
2. La mayoría de los casos se detectaron en muestras de colonización, siendo la orina la muestra clínica más frecuente seguida de las muestras de origen quirúrgico.
3. La infección por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 de inicio comunitario fue una entidad clínica relativamente



frecuente, pero todos los casos estuvieron relacionados con la asistencia sanitaria.

4. *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 fue la especie más frecuente y mostró un patrón de diseminación policlonal, aunque con dos secuenciotipos predominantes: ST405 y ST11, siendo el primero el secuenciotipo asociado al origen del brote, dominante durante los dos primeros años, y desplazado posteriormente por el ST11.
5. Amikacina fue el antibiótico que con mayor frecuencia mantuvo actividad *in vitro* frente a las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 con independencia de la especie.
6. El ertapenem fue el antibiótico carbapenémico con el porcentaje de resistencia más alto y con la CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> más elevadas, siendo por tanto el más sensible para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.
7. Las CMIs a imipenem y meropenem fueron en su mayoría menores o iguales a 8 µg/ml pudiendo ser, siempre en combinación con otro antibiótico activo, potencialmente adecuados en el tratamiento de infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.
8. Los aislados de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 resistentes a cefoxitina fueron significativamente más resistentes a meropenem, tigeciclina y minociclina, quinolonas, fosfomicina y nitrofurantoína.

# Anexo



## **Artículos**

*Infections caused by OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak.*

José Ramón Paño-Pardo, **Guillermo Ruiz-Carrascoso**, Carolina Navarro-San Francisco, Rosa Gómez-Gil, Marta Mora-Rillo, María Pilar Romero-Gómez, Natalia Fernández-Romero, Julio García-Rodríguez, Verónica Pérez-Blanco, Francisco Moreno-Ramos and Jesús Mingorance.

J Antimicrob Chemother. 2012 Jan;68(1):89-96.

*Genome sequence of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae KpO3210.*

Wesselink JJ, López-Camacho E, de la Peña S, Ramos-Ruiz R, **Ruiz-Carrascoso G**, Lusa-Bernal S, Fernández-Soria VM, Gómez-Gil R, Gomez-Puertas P, Mingorance J.

J Bacteriol. 2012 Dec;194(24):6981.

*Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a major clinical challenge.*

Navarro-San Francisco C, Mora-Rillo M, Romero-Gómez MP, Moreno-Ramos F, Rico-Nieto A, **Ruiz-Carrascoso G**, Gómez-Gil R, Arribas-López JR, Mingorance J, Paño-Pardo JR.

Clin Microbiol Infect. 2013 Feb;19(2):E72-9.

*Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens.*

López-Camacho E, Rentero Z, **Ruiz-Carrascoso G**, Wesselink JJ, Pérez-Vázquez M, Lusa-Bernal S, Gómez -Puertas P, Kingsley RA, Gómez-Sánchez P, Campos J, Oteo J, Mingorance J.

Clin Microbiol Infect. 2014 Mar 9.

*Presence of quinolone resistance to qnrB1 genes and bla<sub>OXA-48</sub> carbapenemase in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae in Spain.*

Rodríguez Martínez JM, Díaz-de Alba P, Lopez-Cerero, **Ruiz-Carrascoso G**, Gomez-Gil R, Pascual A.

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014 Aug-Sep;32(7):441-2.

*Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among patients admitted to ICUs in Spain.*

Oteo J, Alcaraz R, Bou G, Conejo C, Díaz-Lamas AM, Fernández-Martínez M, Fontanals D, González-López JJ, López-Contreras J, Martínez-Martínez L, Mora-Rillo M, Muñoz M, Navarro F, Oliver A, Pintado V, **Ruiz-Carrascoso G**, Ruiz-Garbajosa P, Sánchez-Porto A, Sánchez-Romero I, Zamorano L, Aracil B, Rodríguez-Baño J; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) and GEIH-GEMARA (SEIMC).

J Antimicrob Chemother. 2015 Oct;70(10):2916-8.

*Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem.*

Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, González-López JJ, Martínez-García L, Martínez-Martínez L, Merino M, Miró E, Mora M, Navarro F, Oliver A, Pascual Á, Rodríguez-Baño J, **Ruiz-Carrascoso G**, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Campos J; GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI.

Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jun;59(6):3406-12

### **Comunicaciones a congresos**

*First Outbreak of Carbapenem-resistant OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in Spain.*

**G. Ruiz-Carrascoso**, J. R. Paño-Pardo, R. Gómez-Gil, C. Navarro, V. Pérez-Blanco, R. Herruzo, J. Mingorance, J. García-Rodríguez. *Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. Chicago, 2011.

*Clinical features and outcome of 26 bloodstream infections (BSI) caused by OXA-48 producing Enterobacteriaceae in a University Hospital in Spain.*

C. Navarro San Francisco, M. Mora Rillo, M.P. Romero Gómez, A. Rico Nieto, S. Caro Bragado, **G. Ruiz Carrascoso**, R. Gómez Gil, C. Soto Abanades, J. Garcia Rodriguez, JR. Arribas López, JR. Paño Pardo. *22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. Londres, 2012.

Emergencia de un nuevo fenotipo BLEE con resistencia a carbapenem en Enterobacteriaceae: Carbapenemasa OXA-48 con BLEE CTX-M-15.

Maria Rosa Gómez-Gil Mira, **Guillermo Ruíz Carrascoso**, Nieves Seara Sanz, Jesus Mingorance Cruz, Jose Ramón Paño Pardo, Julio García Rodríguez. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao, 2012.

Asociación de los genes *bla<sub>OXA-48</sub>* y *qnrB1* en aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae en España.

J. M. Rodríguez Martínez, P. Díaz De Alba, L. Lopez Cerero, **G. Ruiz**, A. Pascual Hernandez. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao, 2012.

*Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in Spain: results from a national multicenter study, 2013.*

Jesús Oteo, Verónica Bautista, Carmen Conejo, Marta Fernández-Martínez, Juan José González-López, Laura Martínez-García, María Merino, Elisenda Miró, **Guillermo Ruíz**, Laura Zamorano, and the Spanish collaborating group for the study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. Barcelona, 2014.

Evaluación de las placas cromogénicas chromID CARBA y chromID OXA-48 para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 sensibles a cefalosporinas

Carlos vs. Fernando, Cristina Casares, Rosa Gómez-Gil Mira, Julio García Rodríguez, **Guillermo Ruiz Carrascoso**. XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 2014

Incidencia y características microbiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 sensibles a cefalosporinas

Fernando vs. Carlos, Cristina Casares, Elena López Camacho, Patricia Gómez Sánchez, Rosa Gómez-Gil Mira, Julio García Rodríguez, **Guillermo Ruiz Carrascoso**. XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 2014

Estrategia de control de un brote de *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 en una planta hospitalaria de nefrología.

Mayorgas Torralba S, Pérez Blanco V, Iniesta Marmol C, Rivas Becerra B, Sánchez Villanueva R, **Ruiz Carrascoso G**. XVIII congreso de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Murcia, 2015

Descripción de un brote de enterobacterias productoras de carbapenemasa tipo OXA-48 en un servicio de hematología

Villán Villán YF, Pérez Blanco V, Huertas Paredero MV, **Ruiz Carrascoso G**, Canales Albendea M, Mayorgas Torralba S. XVIII congreso de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Murcia, 2015.